Wirkung verschiedener Substitutionsverfahren auf das LH-Muster bei der ovarektomierten Ratte

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
Bonn

vorgelegt von
Karin Kraft
aus Göttingen

Bonn 1980

Wirkung verschiedener Substitutionsverfahren auf das LH-Muster bei der ovarektomierten Ratte

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
Bonn

vorgelegt von
Karin Kraft
aus Göttingen

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Breuer
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Leyendecker

Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. Breuer)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

Abstract

KRAFT, KARIN:

WIRKUNG VERSCHIEDENER SUBSTITUTIONSVERFAHREN AUF DAS LH-MUSTER BEI DER OVAREKTOMIERTEN RATTE

Die Wirkung von chronischer Entblutung bzw. der Volumensubstitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, Haemaccel^{R} oder in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmten Eigenerythrozyten auf das LH-Muster im Plasma ovarektomierter Ratten wurde untersucht. Durch einen Dauerkatheter in der Arteria carotis communis sinistra wurden je 450 µl Blut im Abstand von 10 Minuten über einen Zeitraum von drei Stunden entnommen und mit 450 µl Substitutionsmittel, die Entblutungsversuche ausgenommen, ersetzt. Störungen der Lebensbedingungen der Versuchstiere konnten weitestgehend vermieden werden.

Bei Unterlassung der Substitution sowie bei alleiniger Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung veränderte sich das Sekretionsmuster des radioimmunologisch bestimmten LH. Während Mittelwert und Amplitude der rhythmischen Pulsationen während der gesamten Versuchsdauer konstant blieben, verringerte sich die Frequenz in der zweiten Versuchshälfte signifikant. Dieser Effekt trat bei Substitution mit Haemaccel^{R} bzw. Eigenerythrozyten in NaCl-Lösung nicht auf

Zusätzlich wurden in jeder Blutprobe Hämoglobin, Eiweiß und die Elektrolyte Na^{+} und K^{+} bestimmt. Es ergaben sich hierdurch keine eindeutigen Hinweise auf die auslösende Ursache der Frequenzänderung. Eine gemeinsame Beteiligung vieler z. B. auch endokriner Faktoren ist wahrscheinlich.

Für Untersuchungen der LH-Sekretion der ovarektomierten Ratte bieten sich zwei technisch leicht durchzuführende Verfahren an, wenn größere Blutentnahmen über mehrere Stunden erforderlich sind: Der Volumenersatz durch Eigenerythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung und die Substitution mit Haemaccel.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0043

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1	Einleitung	9
2	Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Reagentien für die radioimmunologische LH-Bestimmung	15
2.1.1.1	Puffer	15
2.1.1.2	Lösungen	15
2.1.1.3	Immunkörper	15
2.1.1.4	Radioaktive Substanzen	16
2.1.2	Elutionschromatographie	16
2.1.2.1	Präparation der K9/15 Säule	16
2.1.2.2	Präparation der K16/70 Säule	16
2.1.3	Volumenersatzmittel	17
2.1.4	Antikoagulantien	17
2.2	Bestimmungsmethoden	17
2.2.1	Hämoglobin	17
2.2.2	Protein	17
2.2.3	Elektrolyte	17
2.2.4	LH	17
2.2.4.1	Aufarbeitung der lyophilisierten Substanzen	17
2.2.4.2	Markierung	18
2.2.4.3	Reinigung	19

Seite

2.2.4.4 Durchführung des Radioimmunoassays 19

2.2.4.5 Qualitätssicherung 19

2.2.4.6 Einfluß von Haemaccel auf den Radioimmunoassay 24

2.3 Experimente 28

2.3.1 Tiere 28

2.3.2 Operationen 28

2.3.2.1 Ovarektomie 28

2.3.2.2 Katheterisierung 28

2.3.3 Vaginalzytologie 28

2.3.4 Blutentnahmen 28

2.4 Statistik 29

3 Ergebnisse 30

3.1 Verlauf der Konzentrationen von Hämoglobin, Eiweiß und Elektrolyten im Plasma 30

3.2 Verlauf der LH-Konzentration im Plasma 41

3.3 Überlebensraten 46

4 Diskussion 47

5 Zusammenfassung 54

A B K Ü R Z U N G E N

LH = Luteinisierendes Hormon

RIA = Radioimmunoassay

NIAMDD = National Institute for Arthritis, Metabolic and Digestive Diseases

EDTA = Äthylendiamintetraacetat

1 EINLEITUNG

Hormonkonzentrationen im Vollblut oder Serum spiegeln den Status des endokrinen Systems wieder. Einmalige Bestimmungen haben allerdings nur eine begrenzte Aussagekraft. Erst durch Verlaufsbeobachtungen können präzisere Informationen gewonnen werden. So sind bei den Gonadotropinen langfristige, zyklische Veränderungen bekannt. Für bestimmte Hormone, wie z. B. Cortisol, ist ein Tagesrhythmus nachgewiesen (8, 27). Innerhalb dieser relativ großen Schwankungen werden noch kurzzeitigere, regelhaft ablaufende Fluktuationen beobachtet. Die Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) im Plasma der ovarektomierten Ratte ist hierfür ein Beispiel (6). Jede Störung endokriner Regulationsvorgänge kann Zyklus, zirkadiane Rhythmik und Kurzzeitpulsationen in charakteristischer Weise beeinflussen. Nur Verlaufsbeobachtungen können diese Veränderungen erfassen und interpretierbar machen. Sie müssen außerdem eingesetzt werden, wenn bei endokrinen Feinregulationen zwischen interindividueller Varianz und tatsächlichen biologischen Vorgängen sicher unterschieden werden soll.

Die Bestimmung von Hormonkonzentrationen im Tierexperiment führt nur dann zu interpretierbaren Ergebnissen, wenn die Probengewinnung für jedes Individuum unter Einhaltung folgender Bedingungen erfolgen kann:

1. Blutentnahmen sollen über einen längeren Zeitraum möglich sein. Nur so können auch langsam eintretende Veränderungen in ihrem Verlauf beobachtet werden.
2. Zwischen den einzelnen Blutentnahmen müssen möglichst kurze, den experimentellen Bedingungen anpaßbare Zeitabstände liegen. Hierdurch ist gewährleistet, daß auch kurzzeitige Konzentrationsänderungen erfaßt werden können.
3. Bei jeder Blutentnahme soll ausreichend Material für mehrere verschiedene Bestimmungen gewonnen werden können, damit voneinander abhängige Parameter direkt miteinander vergleichbar sind.

4. Die Entnahmetechnik selbst darf die zu messenden Parameter nicht durch Verdünnungseffekte, Änderung der Proteinbindung und ähnliche Einwirkungen beeinflussen.
5. Die Durchführung der Entnahmen muß erfolgen, ohne daß das Versuchstier in seinen gewohnten Lebensbedingungen gestört wird.

Die bisher angewandten, in Tabelle 1 zusammengestellten Entnahmetechniken erfüllen diese Bedingungen nur unvollständig. Wie ersichtlich, gibt es prinzipiell drei Möglichkeiten, bei der Ratte Blut zu entnehmen:
1. Entblutung,
2. Punktion,
3. Katheterisierung

Bei der Entblutung muß das Tier getötet werden. Daher ist mit diesem Verfahren nur der momentane endokrine Status zu erfassen. Methodisch können zwei Möglichkeiten unterschieden werden: Die Dekapitation (9) und die Punktion der Aorta abdominalis. Da bei der Dekapitation eine Narkose nicht üblich ist, liegen zwischen Ergreifen des Tiers und Abschluß der Blutgewinnung etwa 20 Sekunden; es können einmalig bis zu 5 ml Blut gewonnen werden. Wegen der bei der Punktion der Aorta abdominalis notwendigen Narkose ist die Blutentnahme erst 6 - 10 Minuten nach Narkosebeginn abgeschlossen, das Entnahmevolumen beträgt bis zu 7 ml.

Innerhalb der Punktionstechniken können drei Verfahren unterschieden werden:
1. Herzpunktion,
2. Punktion der Vena jugularis,
3. Punktion des Sinus orbitalis.

Die Herzpunktion (4) kann in oder ohne Narkose durchgeführt werden, es kann drei- oder viermal bis zu 1 ml Blut entnommen werden. Diese Technik erfordert jedoch entweder die für bestimmte Fragestellungen nachteilige Narkose oder führt zwangsläufig zu erheblichem Streß beim Versuchstier.

Die Punktion der Vena jugularis (16, 23) wird zur Untersuchung von Änderungen der Hormonkonzentration innerhalb eines bestimmten Zeitraumes häufig angewandt. Die Blutentnahme ist nur beim narkotisierten Tier möglich. Für kurz aufeinander folgende Entnahmen ist eine Dauernarkose sinnvoll. Es lassen sich so bis zu sechs Entnahmen je Tier durchführen. Aus physiologischen Gründen darf das Volumen einer Einzelentnahme dabei höchstens 1 ml betragen (23). Ist nur eine einmalige Entnahme beabsichtigt, können dagegen bis zu 4 ml Blut gewonnen werden (23).

Durch die Katheterisierung von Blutgefäßen ergibt sich eine Reihe von Vorteilen gegenüber den anderen Methoden. Eine Narkose während der Blutentnahme ist nicht notwendig. Bisher konnten maximal 20 Proben zu je 0,2 ml Blut in einem Zeitraum von drei Stunden entnommen werden (6). Katheterisiert wurden entweder eine Vena jugularis externa oder eine Arteria carotis communis (3, 6, 13).

Die oben beschriebenen Techniken der Blutentnahme haben verschiedene Nachteile. Für das Studium zeitlicher Verläufe ist die Probengewinnung durch Entblutung ungeeignet. Bei den Punktionsverfahren ist entweder eine Narkose notwendig, oder eine Beeinträchtigung des Versuchstiers durch Schmerzreize bzw. eingeschränkte Bewegungsfreiheit ist unvermeidbar. Vor allem bei der Katheterisierung sind Versuchsdauer, Anzahl der Entnahmen je Zeiteinheit und Entnahmevolumen von einander abhängig. Bei langer Versuchsdauer müssen bei gegebenem Gesamtentnahmevolumen die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Entnahmen entsprechend groß sein, dagegen ist die Versuchszeit bei kurz aufeinander folgenden Entnahmen zeitlich begrenzt.

Eine entsprechende Volumensubstitution, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, vergrößert das bei der Katheterisierung insgesamt mögliche Entnahmevolumen. Dadurch kann das Einzelentnahmevolumen erhöht werden. Es können nun aus einer Plasmaprobe mehrere Bestimmungen durchgeführt werden. Gleichzeitig sind häufigere Entnahmen und eine längere

	ENTBLUTUNG		PUNKTION				KATHETERISIERUNG	
	Dekapitation x	Punktion der Bauchaorta x	Herz (7)	Vena jugularis (16)	(23)	sinus orbitalis (10)	sinus venosus (6) (3)	art. carotis communis (13)
t_G	20 s	6 – 10 min	4h	5h	60min	40 – 60 s	3 h	3 h
t_E	20 s	6 – 10 min	60 s	8 – 10 min	10 s	40 s	variabel	
V_E	2,5 – 5 ml	4 – 7 ml	1 ml	1 ml	1 – 4 ml	1 – 1,5 ml	0,2 – 0,6 ml	0,3 ml
n_E	1	1	3	4	6	1	6 – 20	12
V_G	2,5 – 5 ml	4 – 7 ml	3 ml	4 ml	6 ml	1 – 1,5 ml	3,6 – 4 ml	3,6 ml
NARKOSE	nicht üblich	Äther	Äther oder andere	Äther		Äther	keine	keine

Tabelle 1: Blutentnahmetechniken bei der Ratte

Tabelle 1: Blutentnahmetechniken bei der Ratte

t_G: Gesamtdauer der Entnahme
t_E: Dauer einer Einzelentnahme
V_E: Volumen einer Einzelentnahme
n_E: Anzahl der Entnahmen
V_G: Gesamtvolumen der Entnahmen
x : Eigene Meßwerte
Zahlen in Klammern: Literaturangaben

Versuchsdauer möglich.

Es wird angenommen, daß der pulsatorische LH-Rhythmus im Plasma der ovarektomierten Ratte ziemlich konstant ist. Allerdings ist die Auswirkung chronischer Entblutung auf das LH-Muster bisher noch nicht analysiert worden. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluß des protrahierten Blutverlustes auf den pulsatorischen LH-"Relase" im Plasma der ovarektomierten Ratte untersucht werden. Außerdem werden die Auswirkungen unterschiedlicher Volumensubstitution auf das LH-Muster beschrieben.

2 METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Reagentien für die radioimmunologische LH-Bestimmung

Alle unter 2.1.1.1 und 2.1.1.2 verwandten Reagentien waren, soweit nicht anders angegeben, von p. a.-Reinheitsgrad und wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

2.1.1.1 Puffer

Folgende Puffer wurden für jeden Radioimmunoassay (RIA) frisch zubereitet:
Na-Phosphatpuffer: 0,01 mol/l, pH 7,6 in 0,15 mol/l NaCl (Na-Phosphatpuffer 1),
Na-Phosphatpuffer: 0,5 mol/l, pH 7,5 (Na-Phosphatpuffer 2),
Äthylendiamintetraacetat(EDTA)-Puffer: pH 7,6 , 0,0446 mol/l in Na-Phosphatpuffer 1.

2.1.1.2 Lösungen

Albuminlösung, 1- oder 2 %ig:
10 bzw. 20 g Albumin aus Hühnerei, fünffach gereinigt (Serva Fine Chemicals, Heidelberg), Na-Phosphatpuffer 1 ad 1000 ml.
Chloramin T-Lösung:
7,1 mmol Chloramin T in 1000 ml Na-Phosphatpuffer 1.
$Na_2S_2O_5$-Lösung:
2,6 mmol $Na_2S_2O_5$ in 1000 ml Na-Phosphatpuffer 1.

2.1.1.3 Immunkörper

Vom Rat Pituitary Hormone Distribution Program des National Institute for Arthritis, Metabolic and Digestive Diseases, National Institutes of Health (NIAMDD, NIH) wurden folgende Substanzen zur Verfügung gestellt:

1. Gereinigtes Ratten-LH zur Jodination (NIAMDD-Rat LH-I-4)

2. Antiserum für Ratten-LH, gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen (NIAMDD-Anti-Rat LH-Serum-S-4),
3. Gereinigtes Ratten-LH als Referenzpräparation für den RIA (NIAMDD-Rat LH-RP-1)

Als zweiter Antikörper diente Double-antibody-solid-phase anti-Kaninchen (DASP; Organon,Oberschleißheim): 1,1 ml suspendiertes Konzentrat in 10 ml 1 %igem Albuminpuffer (siehe 2.1.1.2.).

2.1.1.4 Radioaktive Substanzen

Zum Tag der jeweiligen Markierung wurde Natriumjodid [^{125}J] zur Eiweißmarkierung in alkalischer Lösung (pH 8,0) der jüngsten Charge von Behring, Marburg, bezogen.

2.1.2 E l u t i o n s c h r o m a t o g r a p h i e

Bei der radioimmunologischen LH-Bestimmung wurde die Elutionschromatographie als Reinigungsverfahren angewandt. Dazu mußten die nachstehenden Säulen, wie folgt, vorbereitet werden.

2.1.2.1 Präparation der K9/15 Säule

0,8 g Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) wurden 24 Stunden in aqua dest. vorgequollen, anschließend 6 Stunden lang evakuiert und dann auf eine K9/15 Säule (Pharmacia) gegeben. Sie wurde nacheinander mit 30 ml Na-Phosphatpuffer 1, 1 ml 2 %iger Albuminlösung und weiteren 30 ml Na-Phosphatpuffer 1 gewaschen.

2.1.2.2 Präparation der K16/70 Säule

10 g Sephadex G-100 (Pharmacia) wurden 72 Stunden in aqua dest. gequollen, über Nacht evakuiert und dann auf eine K16/70 Säule (Pharmacia) gegeben. Anschließend wurde mit 100 ml Na-Phosphatpuffer 1, 15 ml 1 %iger Albuminlösung und weiteren 100 ml Naphosphatpuffer 1 eluiert.

2.1.3 V o l u m e n e r s a t z m i t t e l

Zur Volumensubstitution wurden 0,9 %ige NaCl-Lösung (Fresenius, Bad Homburg) bzw. eine 3,5 %ige kolloidale Polypeptidlösung (Haemaccel^{R}, Behring, Marburg) oder eine zweifach gewaschene Suspension von Rattenerythrozyten benutzt.

2.1.4 A n t i k o a g u l a n t i e n

Zur Gerinnungshemmung wurde Na-Heparinat (Liquemin^{R}, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, verwendet.

2.2 BESTIMMUNGSMETHODEN

2.2.1 H ä m o g l o b i n

Der Hämoglobingehalt jeder Blutprobe wurde nach der Cyanhämiglobinmethode im Coulter Counter (Modell F_N) bestimmt (15).

2.2.2 P r o t e i n

Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte nach der von Lowry et al. (18) beschriebenen Methode im 1 + 99 verdünnten Plasma.

2.2.3 E l e k t r o l y t e

Die Konzentration der Elektrolyte Na^+ und K^+ im Plasma wurde flammenphotometrisch bestimmt.

2.2.4 L H

Die unter 2.2.4.1 bis 2.2.4.4 beschriebenen Verfahren wurden gemäß der vom NIAMDD herausgegebenen Arbeitsanweisungen (21) sowie unter Berücksichtigung weiterer Quellen (4, 12, 14, 19, 20, 22) erstellt.

2.2.4.1 Aufarbeitung der lyophilisierten Substanzen

NIAMDD-Rat LH-I-4 wurde in Na-Phosphatpuffer 1 zur Konzentration 100 mg/l gelöst. Anschließend wurde die Lösung zu 25 µl-

-Mengen portioniert, in einer Trockeneis-Äthanol-Mischung schockgefroren und bei -20° C aufbewahrt.

NIAMDD-Anti-Rat LH-Serum-S-4 wurde 1 + 99 in EDTA-Puffer (siehe 2.1.1.1) gelöst, in Portionen zu 50 µl, wie oben beschrieben, schockgefroren und ebenfalls bei -20° C aufbewahrt. Für den RIA wurden hiervon jeweils 150 ul aufgetaut und mit EDTA-Puffer auf 15 ml verdünnt.

NIAMDD-Rat LH-RP-1 wurde in 1 %iger Albuminlösung zu einer Konzentration von 2,56 mg/l gelöst, in 50 µl-Portionen schockgefroren und bei -20° C aufbewahrt.

2.2.4.2 Markierung

(^{125}J) wurde mit Na-Phosphatpuffer 2 auf 1 mCi/10 µl verdünnt. In ein Polystyrolröhrchen (16/100, Greiner Labortechnik) wurden nacheinander eingebracht:

10 µl Chloramin T-Lösung
10 µl NIAMDD-Rat LH-I-4 ≙ 10 µg Hormon
0,5 mCi (^{125}J)

Bis zum Start der Reaktion blieben die einzelnen Lösungen voneinander getrennt. Die Reagentien wurden 20 Sekunden vorsichtig durch Schütteln gemischt und die Reaktion dann durch Zugabe von 100 µl $Na_2S_2O_5$-Lösung gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend sofort auf die nach 2.1.2.1 vorbereitete K9/15 Säule gegeben und mit Na-Phosphatpuffer 1 eluiert. Es wurden bei einer Vorgabe von je 0,1 ml 2 %iger Albuminlösung 40 Fraktionen zu je 0,4 ml gesammelt. Aus jeder Fraktion wurden dann 5 µl im automatischen Gammaspektrometer (LKB Wallace 8000) eine Minute gezählt. Wie Abb. 1 zeigt, konnten zwei radioaktive Bestandteile voneinander getrennt werden. Das markierte Ratten--LH konnte mit 4,4 ml eluiert werden, wohingegen zur Elution der freien Jodsalze 8,0 ml notwendig waren. Im Röhrchen mit der größten Aktivität innerhalb des ersten Peaks befand sich das immunaktivste LH (20). Diese Fraktion wurde unmittelbar nach der Messung auf 900 000 bis 1 200 000 cpm/ml mit 2 %iger Albuminlösung verdünnt, um den "damage" möglichst gering zu halten.

Das markierte LH wurde zum Teil am folgenden Tag im RIA benutzt und dazu mit 1 %iger Albuminlösung auf 170 000 bis 200 000 cpm/l verdünnt. Das restliche LH wurde bis zu seiner Verwendung in 500 µl-Portionen bei -20° C aufbewahrt.

2.2.4.3 Reinigung

Nicht sofort benutztes markiertes LH muß vor seiner Wiederverwendung von Zerfallsprodukten gereinigt werden (21). Auf die nach 2.1.2.2 vorbereitete K16/70 Säule wurde das radioaktive LH aufgetragen und mit 200 ml Na-Phosphatpuffer 1 eluiert. Es wurden 72 Fraktionen zu je 1,5 ml gesammelt und im Gammazähler gezählt. Abb. 2 zeigt den charakteristischen Verlauf der Elutionschromatographie. Die Fraktion des ersten Peaks mit der höchsten Aktivität wurde mit 1 %iger Albuminlösung auf 170 000 bis 200 000 cpm/ml verdünnt.

2.2.4.4 Durchführung des RIA

Die radioimmunologische LH-Bestimmung wurde nach einer Doppelantikörpermethode durchgeführt. Sie erfolgte nach dem in Tab. 2 angegebenen Schema. Die Meßwerte wurden mit Hilfe einer in jedem RIA neu erstellten Eichkurve ausgewertet. Sie wurde durch eine Verdünnungsreihe des NIAMDD-Rat LH-RP-1 mit 1 %iger Albuminlösung erhalten. Der Meßbereich lag zwischen 4 und 256 ng. Eine charakteristische Eichkurve ist in Abb. 3 dargestellt.

2.2.4.5 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung wurden Präzision und Empfindlichkeit bestimmt sowie Richtigkeits- und Plausibilitätskontrolle durchgeführt.

Zur Bestimmung der Präzision wurde bei jedem Radioimmunoassay ein Standard gemessen, der aus einem Pool von Rattenplasma selbst hergestellt worden war. Insgesamt reichte der Pool für die Durchführung von Dreifachbestimmungen in 11 Versuchsreihen. Die Variationskoeffizienten der Dreifachbestimmung schwankten zwischen 1,4 und 5,4 % ("intraassay"-Genauigkeit: 2,9 %). Die "interassay"-Präzision betrug 6,6 %.

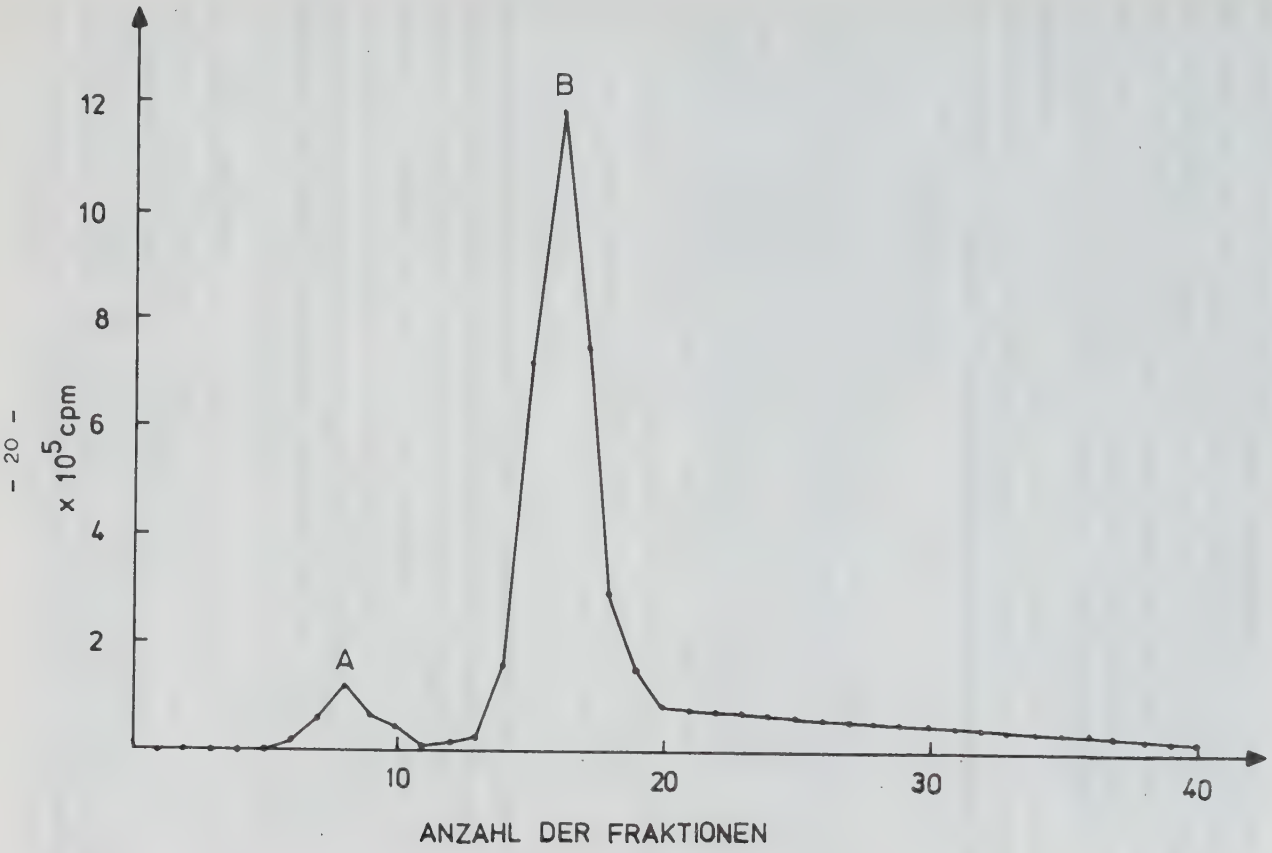

Abb. 1

Abb. 1

Markierung von NIAMDD-Rat LH-I-4 mit Na $^{(125)}$ J, Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen.
Peak A enthält das immunaktive markierte LH, für den Radioimmunoassay wurden die Fraktionen 7 - 9 verwendet.
Peak B enthält die freien Jodsalze.

Das Volumen jeder Fraktion betrug 0,5 ml, davon wurden jeweils 5 µl gezählt.

Tabelle 2: Durchführung des RIA

	In Reaktionsgefäße (Eppendorf Nr. 3810) werden nacheinander einpipettiert:	
1. Inkubation (Reaktion mit dem ersten Antikörper)	unverdünntes Plasma	x µl
	1 %ige Eiweißlösung	500 - x µl
	radioaktiv markiertes LH (170 000 - 200 000 cpm/ml; siehe 2.2.4.2 bzw. 2.2.4.3)	100 µl
	NIAMDD-Anti-Rat LH-Serum-S-4 in EDTA-Puffer (siehe 2.2.4.1)	200 µl
	24 h bei Raumtemperatur inkubieren.	
2. Inkubation (Reaktion mit dem zweiten Antikörper)	DASP (siehe 2.1.1.3)	500 µl
	4 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (Heidolph Elektro KG) inkubieren.	
Aufarbeitung des Präzipitats	1. Zentrifugation: 10 min, 1000xg, 4° C (Becherkühlzentrifuge, Typ UJ 11KS, Heraus Christ GmbH, Osterode)	
	Überstand absaugen,	
	Präzipitat in 1 ml Na-Phosphatpuffer 1 aufnehmen,	
	2. Zentrifugation: 20 min, 1000xg, 4° C	
	Überstand absaugen.	
	Radioaktivität des Präzipitats im Gammazähler messen.	

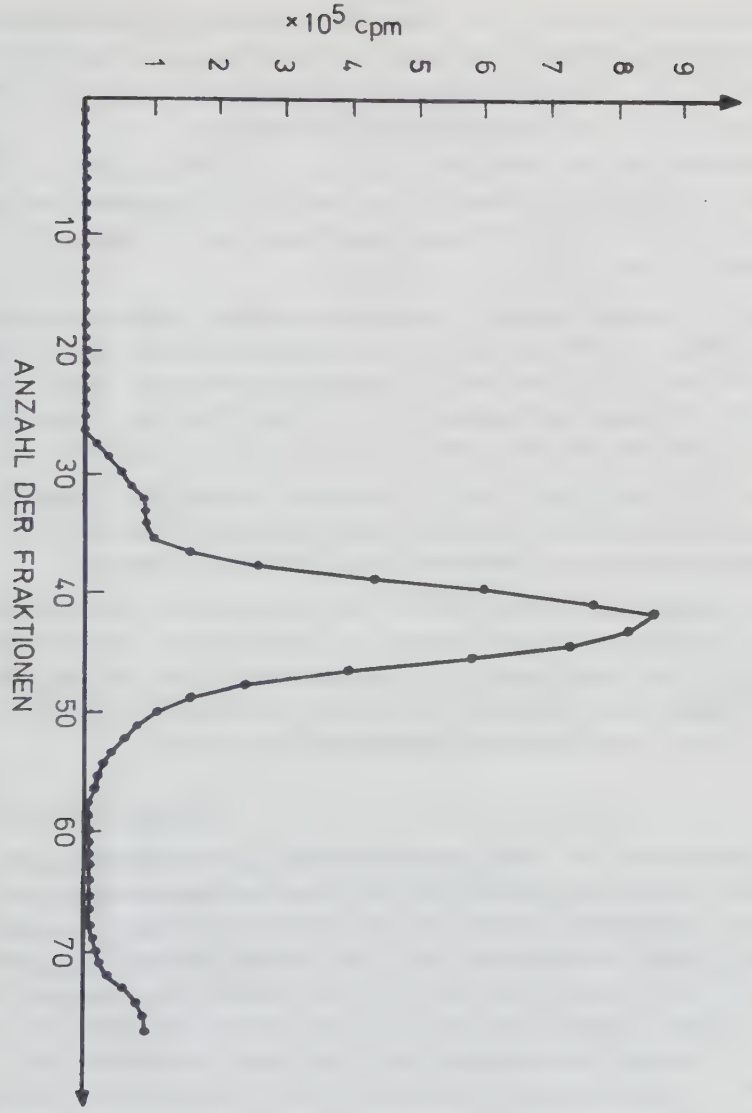

Abb. 2

Elutionschromatographie des mit $^{(125)}J$ markierten LH (Sephadex G-100, Puffer 8, 72 Fraktionen zu je 1,5 ml).

Die Empfindlichkeit wurde durch die Unterscheidungsfähigkeit ("resolving power"), die untere Nachweisgrenze ("detection limit") und die Standardabweichung einer aus 18 Einzeleichkurven erstellten Standardkurve überprüft.

Die Unterscheidungsfähigkeit betrug im niedrigen Meßbereich 3 ng und bei hohen Werten 30 ng (Abb. 3). Die untere Nachweisgrenze war 4 ng. Die Standardabweichung der Eichkurve lag zwischen 1,8 und 3,6 %.

Aus 18 Einzeleichkurven wurde eine mittlere Eichkurve errechnet (Abb. 4). Bezogen auf diese Eichkurve betrug die Standardabweichung der Eichkurven im niedrigen Meßbereich (4 - 32 ng) 5,7 %, im hohen Meßbereich (64 - 256 ng) 12,8 %. Daraus ergibt sich, daß der optimale Meßbereich zwischen 4 und 32 ng liegt.

Die Richtigkeit wurde durch von einem auswärtigen Laboratorium bezogene Plasmen verschiedener Konzentration überprüft. Die gemessenen Werte stimmten mit den Sollwerten überein.

Zur Plausibilitätskontrolle wurden Plasmen von ovarektomierten und normalen weiblichen Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus, von kastrierten und normalen männlichen Ratten sowie von infantilen Ratten gemessen. Die ermittelten Werte stimmten mit den Literaturangaben überein (5, 6, 8, 26).

2.2.4.6 Einfluß von Haemaccel auf den Radioimmunoassay

Bei Anwendung von Substitutionsmitteln wie Haemaccel wird durch Zufuhr körperfremder Eiweiße die Plasmazusammensetzung verändert. Eine Beeinflussung der LH-Bestimmung in nicht vorhersehbarer Weise erschien möglich. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Standardkurven ermittelt. Dabei wurde bei einer von beiden die Albuminlösung anteilig durch 20 µl Haemaccel ersetzt. Dieses entspricht der maximal zu erwartenden Konzentration in den nach 2.3.4 gewonnenen Blutproben. Wie Abb. 5 zeigt, lassen die beiden Standardkurven keine auffälligen Unterschiede erkennen. Lediglich im Meßbereich 4 ng weichen sie voneinander ab.

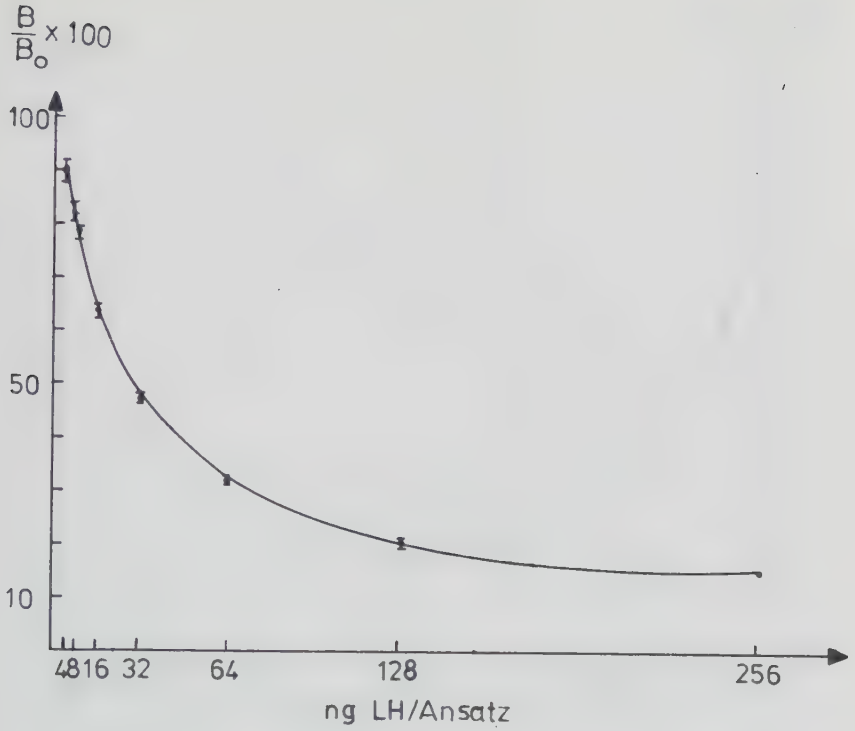

Abb. 3

Standardkurve für den Radioimmunoassay.

B_o: Radioaktivität des Ansatzes für die "spezifische Bindung" (kein Zusatz von unmarkiertem LH zum Ansatz).

B : Radioaktivität der Ansätze mit Zusatz einer bekannten Menge unmarkiertem LH.

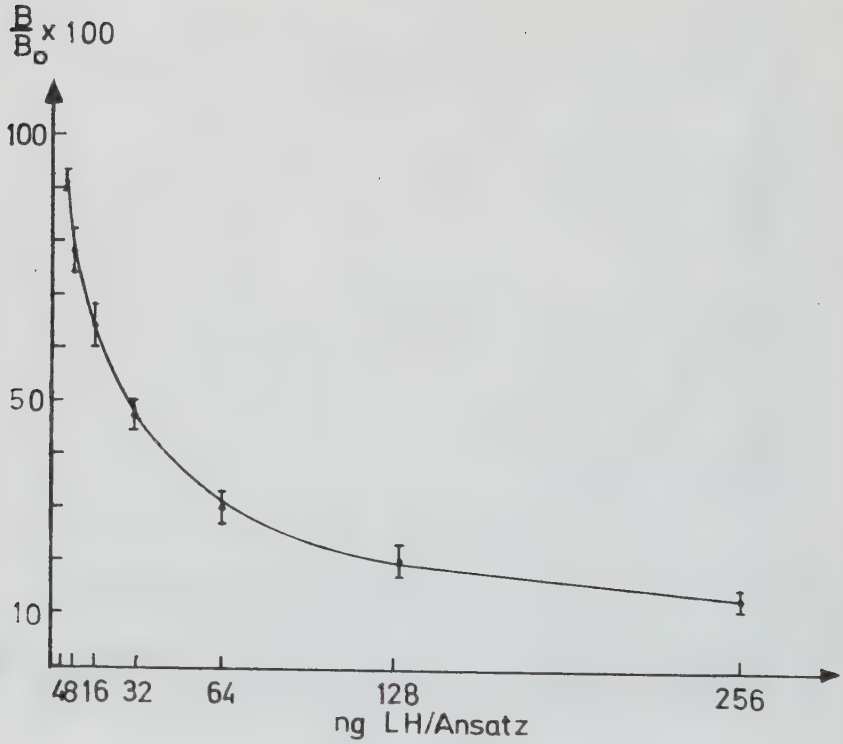

Abb. 4

Rechnerisch ermittelte Standardkurve aus 18 Einzelstandardkurven mit Standardabweichungen.

B_o: Mittelwert der "spezifischen Bindung" von 18 Radioimmunoassays.

B : Mittelwert der Messungen von Ansätzen mit Zusatz einer bekannten Menge unmarkiertem LH von 18 Radioimmunoassays.

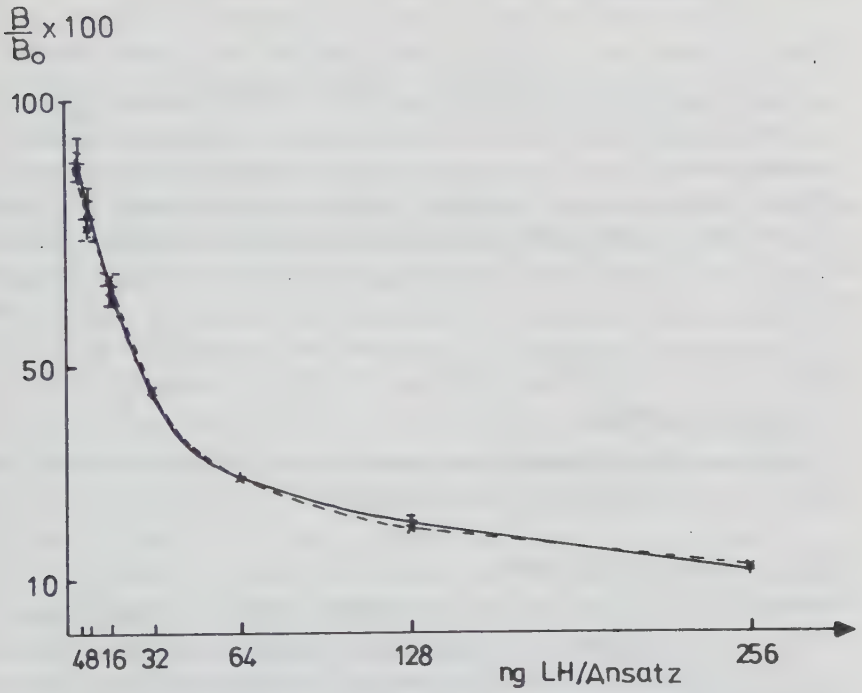

Abb. 5

Einfluß von Haemaccel auf den Radioimmunoassay.
Durchgezogene Linie: Normale Standardkurve.
Gestrichelte Linie : Standardkurve bei Zugabe von 20 µl Haemaccel.

B_o: Radioaktivität des Ansatzes für die "spezifische Bindung" (kein Zusatz von unmarkiertem LH zum Ansatz).

B : Radioaktivität der Ansätze mit Zusatz einer bekannten Menge unmarkiertem LH.

2.3 EXPERIMENTE

2.3.1 T i e r e

Die Versuche wurden an weiblichen, 180 - 200 g schweren, geschlechtsreifen Ratten eines Sprague-Dawley- Auszuchtstammes (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden) durchgeführt. Sie wurden in demselben Laboratorium gehalten, in dem auch die Experimente erfolgten. Die Beleuchtungsperiode dauerte von 6.00 - 18.00 Uhr; die Tiere erhielten Futter und Wasser ad lib.

2.3.2 O p e r a t i o n e n

2.3.2.1 Ovarektomie

30 Tage vor Beginn der Blutentnahmen wurden die Ratten von ventral in Äthernarkose ovarektomiert.

2.3.2.2 Katheterisierung

Mindestens 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde in Äthernarkose ein 12,5 cm langer Katheter in die Arteria carotis communis sinistra gelegt und mit einem Mandrin verschlossen (17). Der Katheter wurde täglich mit 200 USP. E. Heparin gespült.

2.3.3 V a g i n a l z y t o l o g i e

Vor der Katheterisierung wurde mit einer Platinöse von jedem Tier ein Vaginalabstrich entnommen. Er wurde an der Luft getrocknet, durch Hitze und Eintauchen in Methanol für 20 Sekunden fixiert und mit 20 %iger Giemsalösung 30 Minuten gefärbt.

2.3.4 B l u t e n t n a h m e n

Die Entnahmen wurden stets von 14.00 - 17.00 Uhr durchgeführt. Eine Stunde vor Entnahmebeginn wurde jedes Tier gewogen und wieder in seinen Einzelkäfig gesetzt. Dann wurde der Katheter nach Entfernung des Mandrins über ein stählernes Zwischenstück um 35 cm durch einen Schlauch (Polyäthylen

PP 50 x 100 Ft, Portex, England) verlängert und über eine Kanüle mit einer Tuberkulinspritze verbunden. Durch diese Versuchsanordnung war die freie Beweglichkeit der Tiere im Käfig sowie der ungehinderte Zugang zu Futter und Wasser gewährleistet.

Es wurden 18 Einzelentnahmen zu je 450 µl Blut durchgeführt. Das insgesamt entnommene Blutvolumen betrug demnach 8,1 ml. Die Entnahmen erfolgten regelmäßig in 10-minütigem Abstand.

Vier Gruppen (A,B,C,D) wurden gebildet.
Die Gruppe A (6 Tiere) erhielt keine Volumensubstitution. Um einer Thrombosierung des Katheters vorzubeugen, wurden nach jeweils 60 Minuten 100 USP. E. Heparin gespritzt.

Bei der Gruppe B (5 Tiere) erhielten die Tiere nach jeder Blutentnahme 450 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung, zusätzlich nach jeweils 60 Minuten 100 USP. E. Heparin.

In der Gruppe C (5 Tiere) wurden nach jeder Blutentnahme 450 µl Haemaccel, dem nach jeweils 60 Minuten 100 USP. E. Heparin zugesetzt wurden, infundiert.

In der Gruppe D (3 Tiere) wurde das Blut im Anschluß an die Entnahme in einer Zentrifuge (Eppendorf 3200) eine Minute zentrifugiert, der Überstand entfernt, der zelluläre Anteil zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 450 µl aufgefüllt und dann infundiert. Auch hier wurden alle 60 Minuten 100 USP. E. Heparin hinzugefügt.

Allen Blutproben wurden nach Gewinnung zunächst 20 µl zur Hämoglobinbestimmung entnommen. Anschließend wurden sie 1 Minute zentrifugiert und das so gewonnene Plasma bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

2.4 STATISTIK

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der Meßdaten wurden die Standardvarianzanalyse und der t-Test nach Student angewandt (25).

3 ERGEBNISSE

3.1 VERLAUF DER KONZENTRATIONEN VON HÄMOGLOBIN, EIWEISS UND ELEKTROLYTEN IM PLASMA

Zur Kontrolle der Sauerstoffversorgung während der Versuchsdauer wurden die jeweiligen Hämoglobinkonzentrationen bestimmt. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, blieb die Konzentration nur bei der Gruppe D, die gewaschene Eigenerythrozyten (siehe 2.3.4) erhielt, nahezu konstant. Bei den anderen Gruppen nahm sie kontinuierlich ab. Der gemittelte Ausgangswert für alle Tiere betrug 14 g/100 ml. Nach 3 Stunden war die Hämoglobinkonzentration bei der Gruppe A, die nicht substituiert wurde, um 32 % gefallen, bei den Gruppen B und C, die 0,9 %ige NaCl-Lösung bzw. Haemaccel erhielten, nahm sie um 43 bzw. 46 % ab. Der deutliche, aber nicht signifikante Unterschied zwischen der Gruppe A und den Gruppen B und C dürfte auf die im Volumenmangel eintretende Hämokonzentration zurückzuführen sein.

Die Plasmaeiweißkonzentrationen geben Aufschluß über die Veränderung der kolloidosmotischen Druckverhältnisse. Die aus allen Ausgangswerten errechnete mittlere Eiweißkonzentration von 6,2 g/l sank im Versuchsablauf um 31 % auf 4,3 g/l ab (siehe Abb. 7).

Der Hydratationszustand der Versuchstiere sollte durch Bestimmung der Konzentrationen von Na^+ und K^+ im Plasma beurteilt werden. Dabei ergaben sich für Na^+ in allen vier Versuchsgruppen Schwankungen zwischen 120 und 155 mmol/l im Versuchsablauf (Abb. 8 a - d). Die K^+-Konzentrationen schwankten bei allen Versuchsgruppen zwischen 2,5 und 4 mmol/l. Plötzliche Konzentrationsanstiege über 4 mmol/l führten innerhalb von 20 Minuten stets zum Tod des Versuchstieres. Der Anstieg war nicht durch Hämolyse bedingt (Abb. 9 a - d).

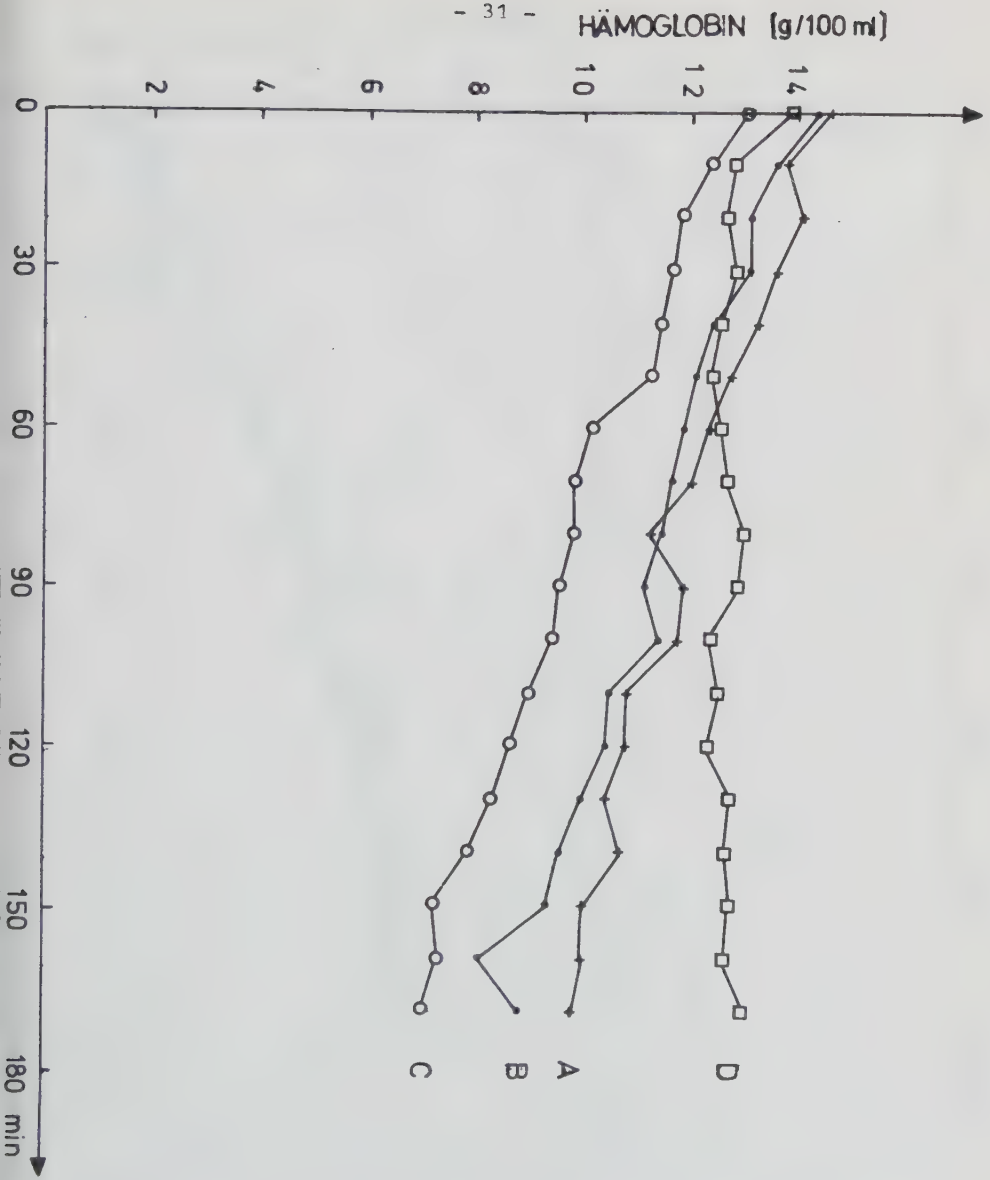

Abb. 6

Zeitlicher Verlauf der Hämoglobinkonzentration.
Substitution: Keine (A), 0,9 %ige NaCl-Lösung (B),
Haemaccel (C), Eigenerythrozyten (D).

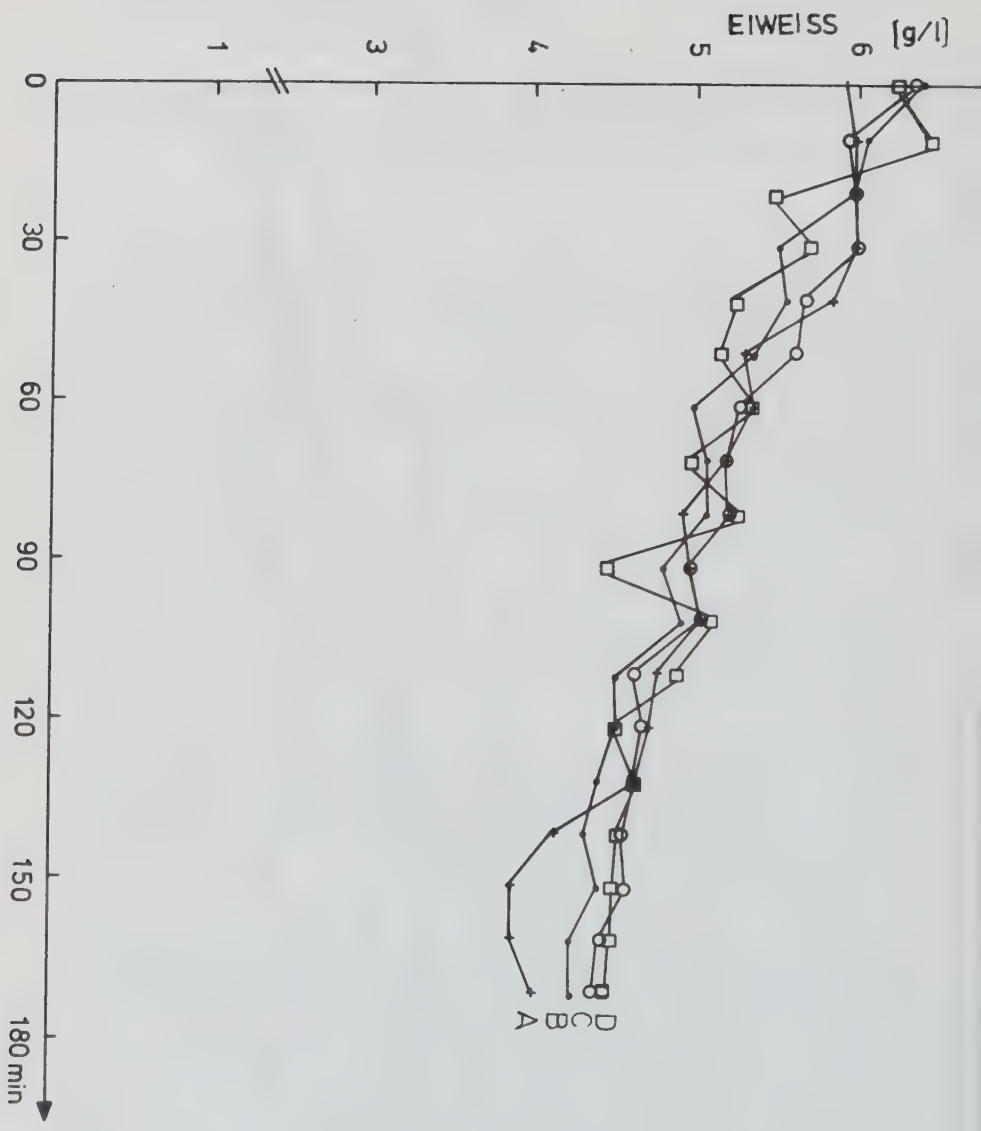

Abb. 7

Zeitlicher Verlauf der Plasmaeiweißkonzentration.
Substitution: Keine (A), 0,9 %ige NaCl-Lösung (B),
Haemaccel (C), Eigenerythrozyten (D).

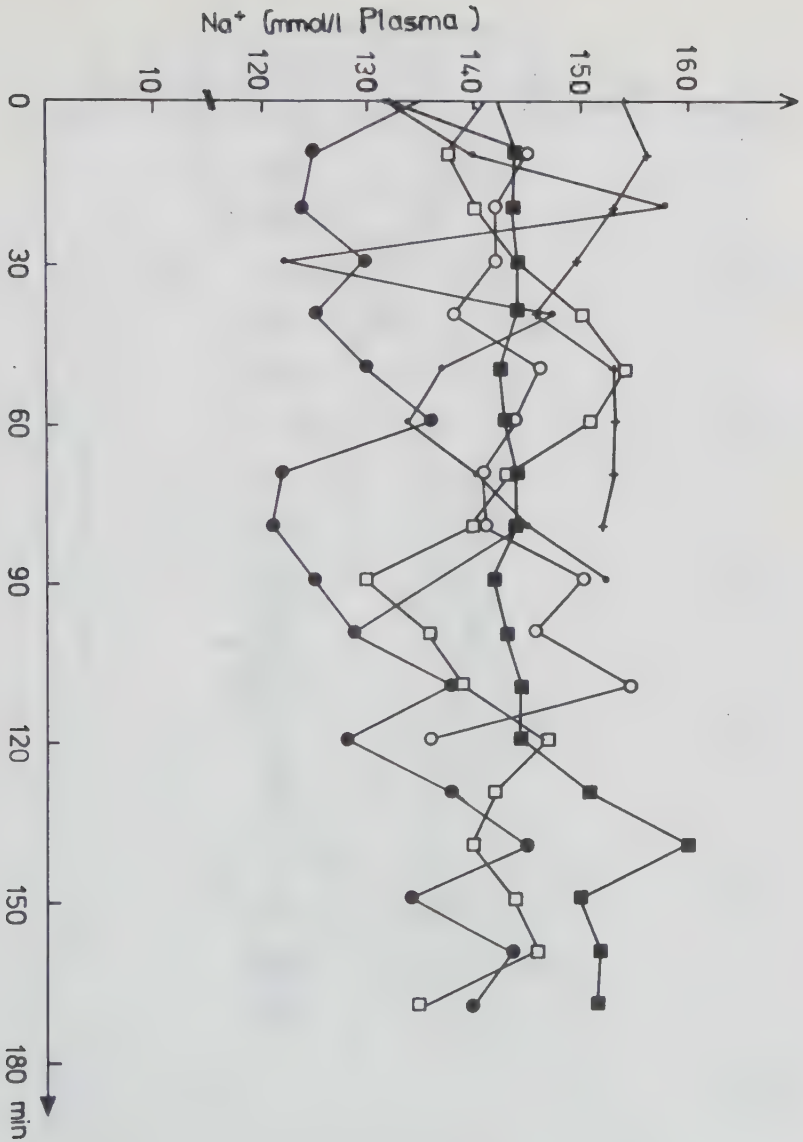

Abb. 8a

Zeitlicher Verlauf der Na^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe A (keine Substitution). Die einzelnen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

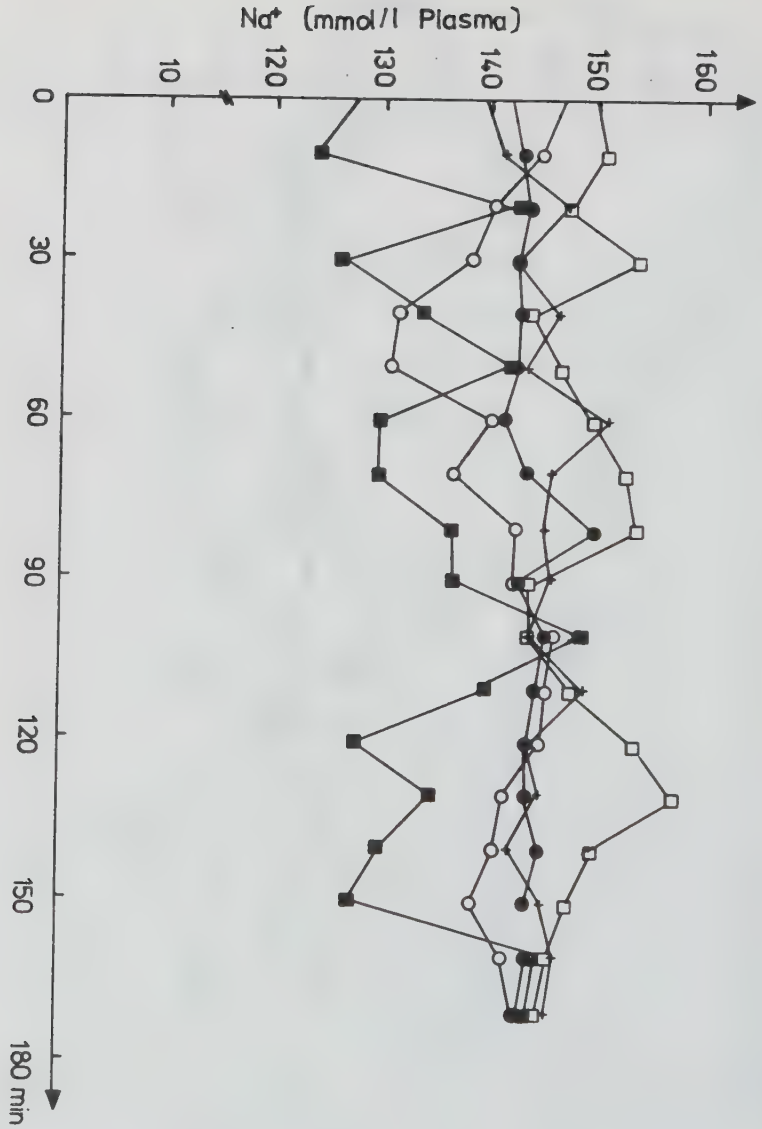

Abb. 8b

Zeitlicher Verlauf der Na^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe B (Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

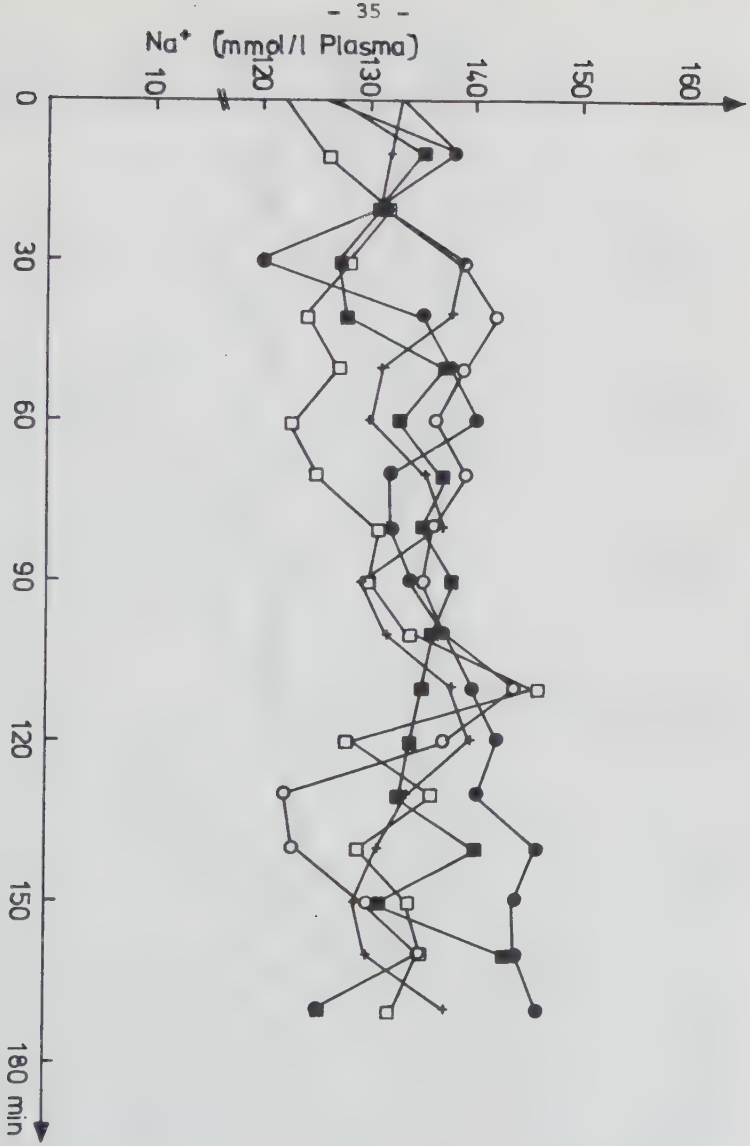

Abb. 8c

Zeitlicher Verlauf der Na^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe C (Substitution mit Haemaccel). Die verschieden Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

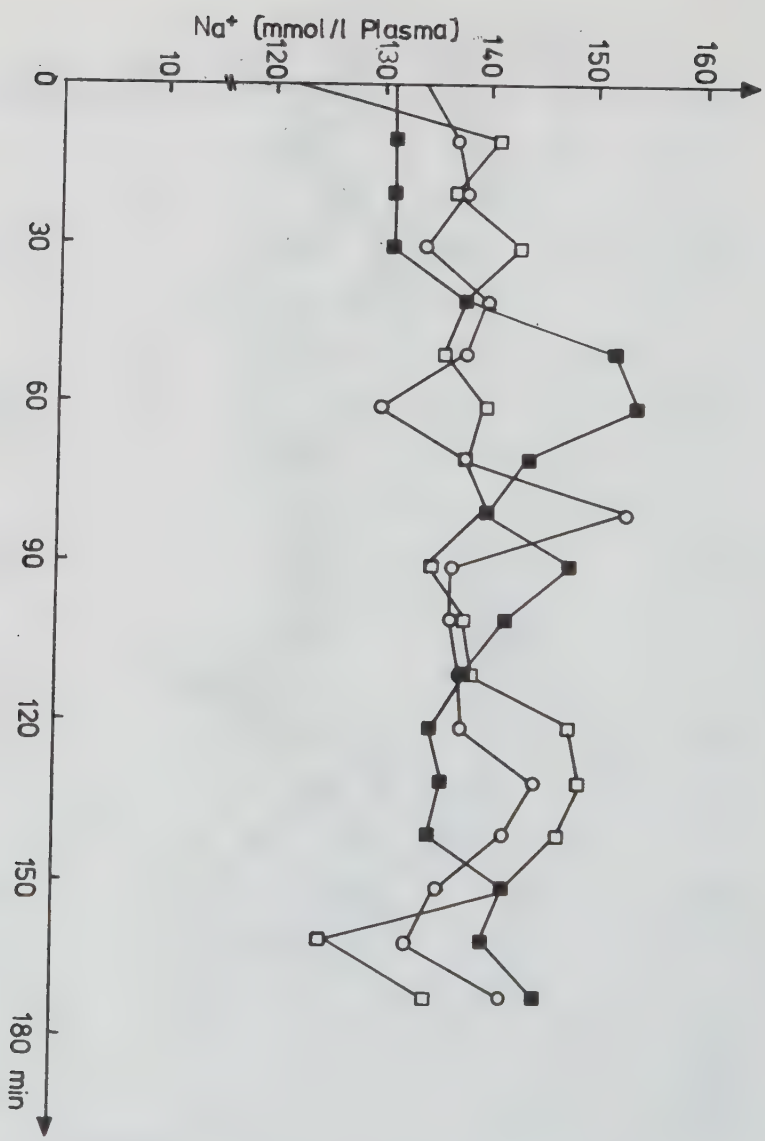

Abb. 8d

Zeitlicher Verlauf der Na^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe D (Substitution mit Eigenerythrozyten). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

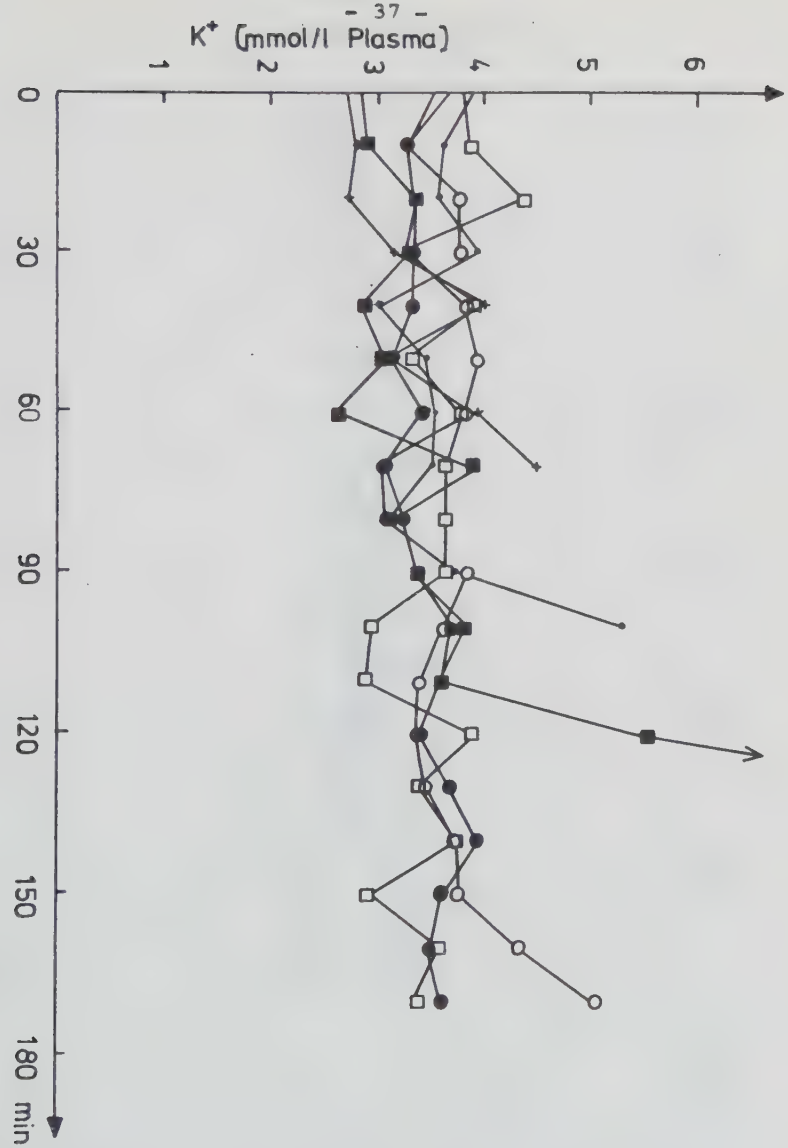

Abb. 9a
Zeitlicher Verlauf der K^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe A (keine Substitution). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

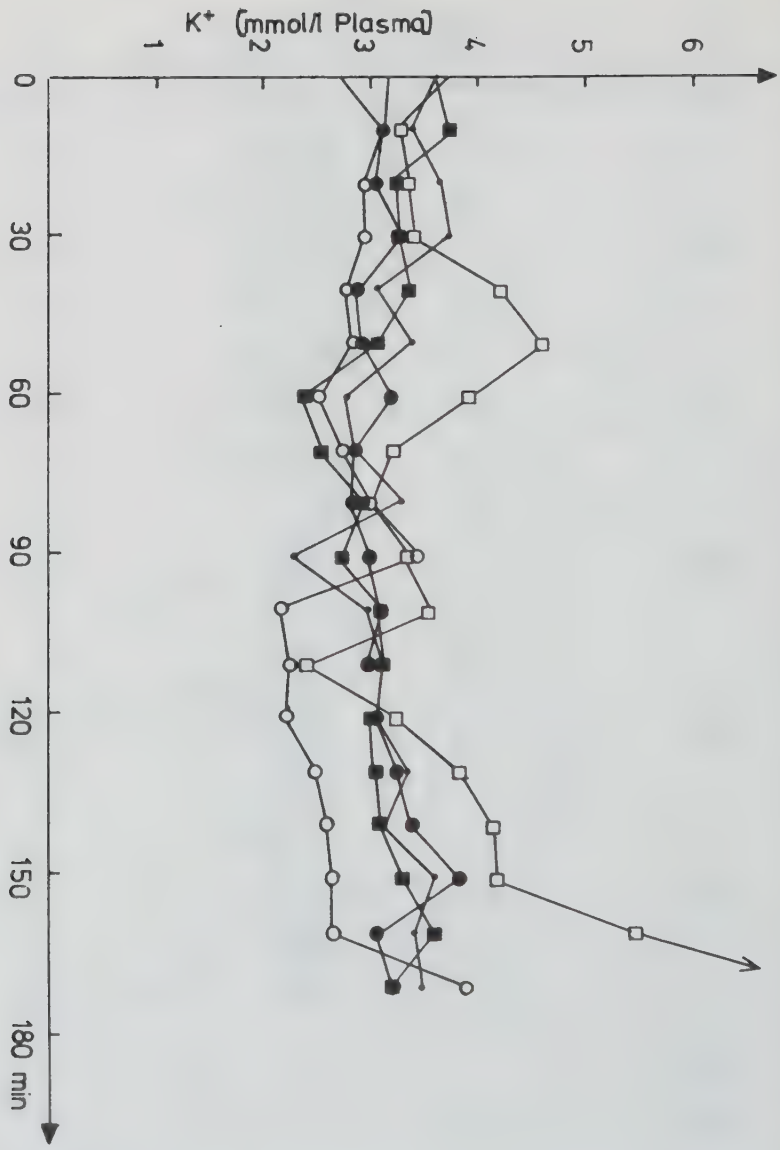

Abb. 9b

Zeitlicher Verlauf der K^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe B (Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

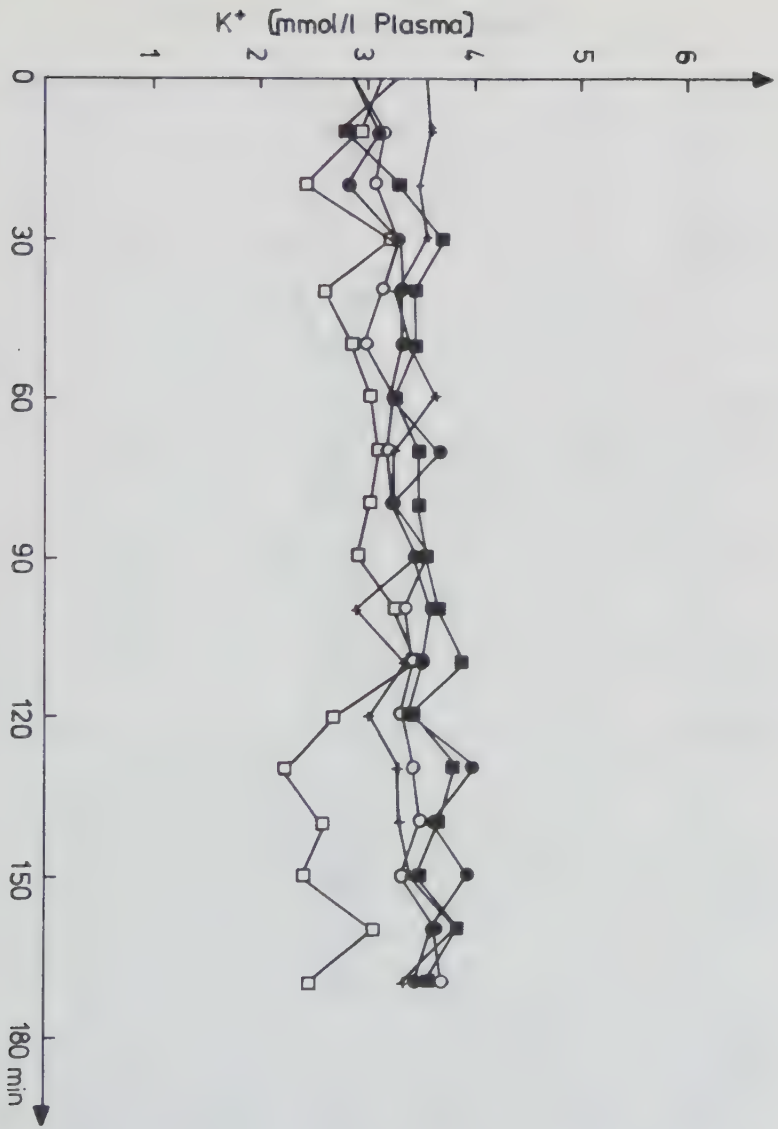

Abb. 9c
Zeitlicher Verlauf der K^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe C (Substitution mit Haemaccel). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

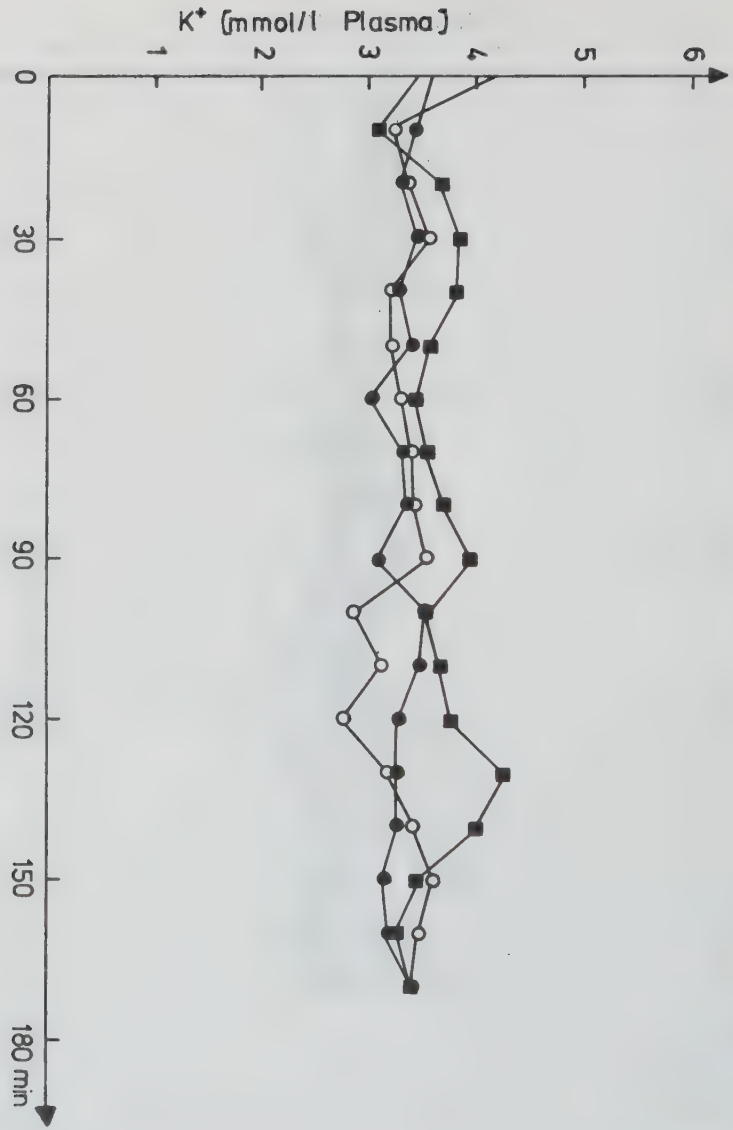

Abb. 9d

Zeitlicher Verlauf der K^+- Konzentration im Plasma bei Gruppe D (Substitution mit Eigenerythrozyten). Die verschiedenen Symbole entsprechen einzelnen Individuen.

3.2 VERLAUF DER LH-KONZENTRATION IM PLASMA

Für jedes Tier wurde der individuelle LH-Konzentrationsverlauf im Plasma aufgezeichnet. Ein Beispiel ist in Abb. 10 dargestellt. Aus den Meßdaten wurde die mittlere LH-Konzentration errechnet und in das zugehörige Diagramm eingezeichnet. Sie repräsentiert, wie aus Abb. 10 ersichtlich den Konzentrationsverlauf während der gesamten Versuchszeit. Wie Abb. 11 zeigt, ergaben sich für den Mittelwert der LH-Konzentration zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Differenzen.

Außer der mittleren LH-Konzentration wurde die aus jeder individuellen Kurve jeweils errechnete Frequenz zur Beurteilung herangezogen. Für die einzelnen Gruppen ergaben sich unterschiedliche Fluktuationsfrequenzen, ausgedrückt als Perioden/60 Minuten. So lag die Gruppe A mit 2,1 $\pm$ 0,3/60 Minuten deutlich unter den Gruppen C mit 2,5 $\pm$ 0,1/60 Minuten und D mit 2,5 $\pm$ 0,3/60 Minuten. Die Gruppe B mit 2,0 $\pm$ 0,2/60 Minuten unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von Gruppe C und deutlich von Gruppe D (Abb. 12).

Beim Betrachten der individuellen LH-Konzentrationskurven fiel auf, daß diese bei einigen Tieren in der zweiten Versuchshälfte verändert aussahen (vergl. Abb. 10). Andere Tiere zeigten während der gesamten Entnahmezeit eine gleichförmigen Verlauf der LH-Konzentration. Deshalb wurde der Versuchszeitraum halbiert und die Frequenz für jede Versuchshälfte getrennt bestimmt. Innerhalb der ersten 90 Minuten ergab sich für alle Gruppen ein Wert von 2,4/60 Minuten (Abb. 13). In der zweiten Versuchshälfte betrug die Frequenz bei Gruppe A 1,9/60 Minuten, bei Gruppe B 1,8/60 Minuten und bei den Gruppen C und D 2,6/60 Minuten. Der Frequenzunterschied zwischen den Gruppen A und B gegenüber den Gruppen C und D war in der zweiten Versuchshälfte signifikant mit $p < 0,01$, ebenso der Unterschied zwischen erster und zweiter Versuchshälfte bei den Gruppen A und B ($p < 0,01$).

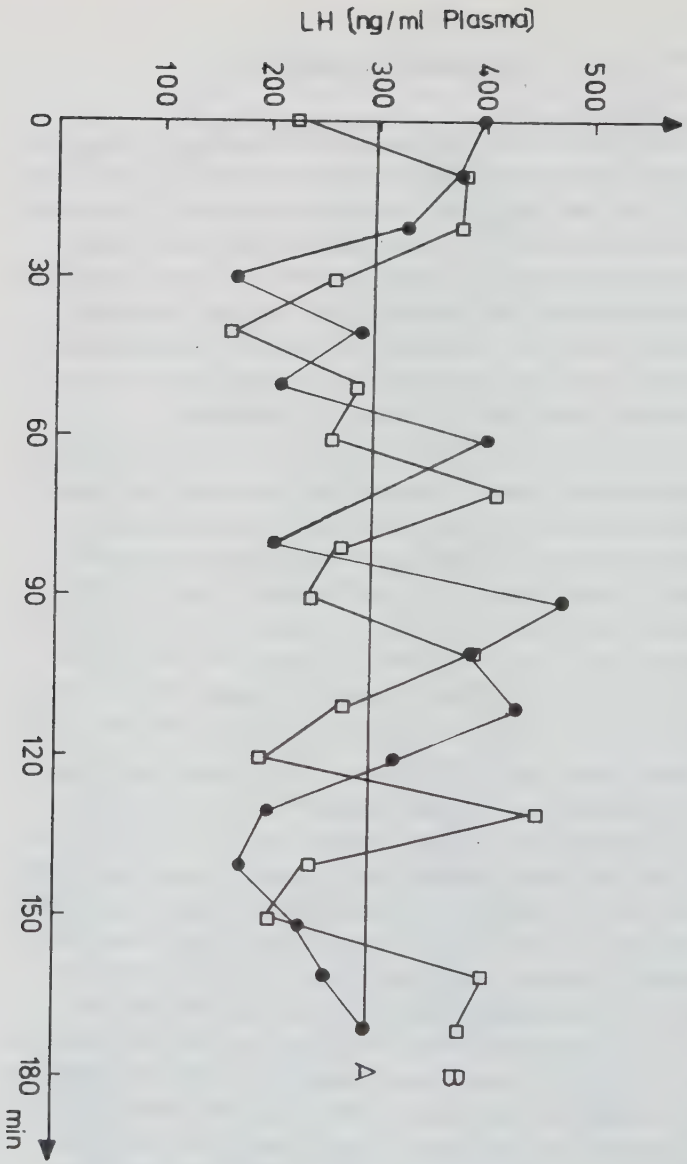

Abb. 10

Verlauf der LH-Konzentration im Plasma der Ratten A und B während des Versuchs (Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (A) bzw. Haemaccel (B).

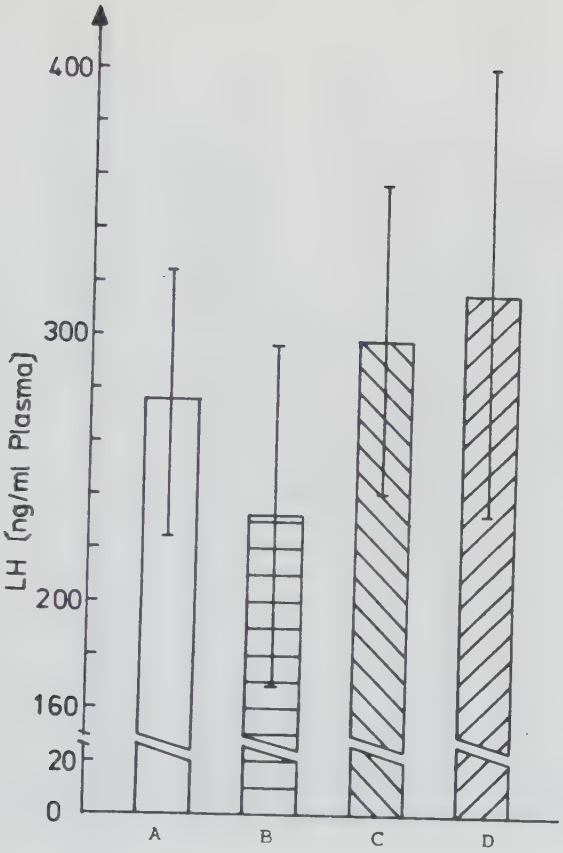

Abb. 11

Mittleres Niveau der LH-Konzentration in den Gruppen A - D.

A: Keine Substitution,

B: Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung,

C: Substitution mit Haemaccel,

D: Substitution mit Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung.

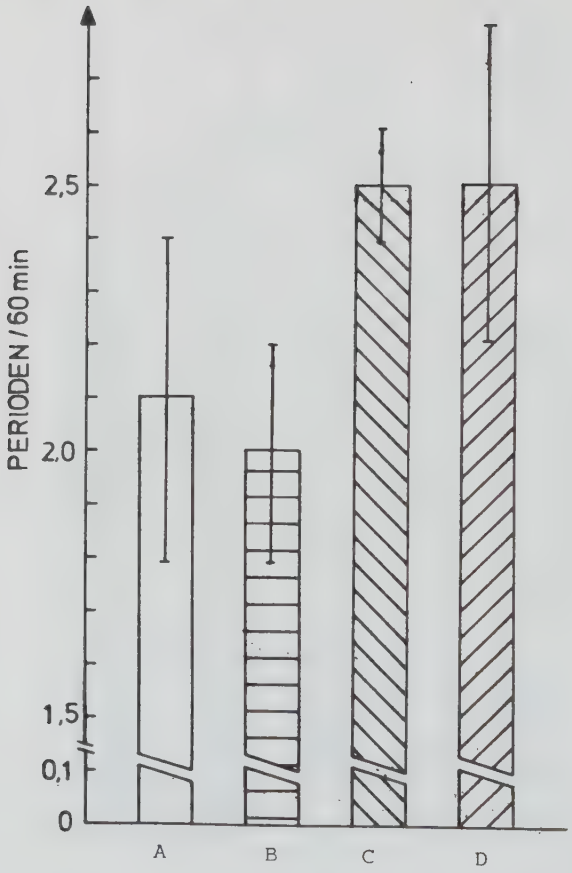

Abb. 12

Mittlere Frequenz der LH-Sekretion in den Gruppen A - D während der gesamten Versuchsdauer.
A: Keine Substitution,
B: Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung,
C: Substitution mit Haemaccel,
D: Substitution mit Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung.

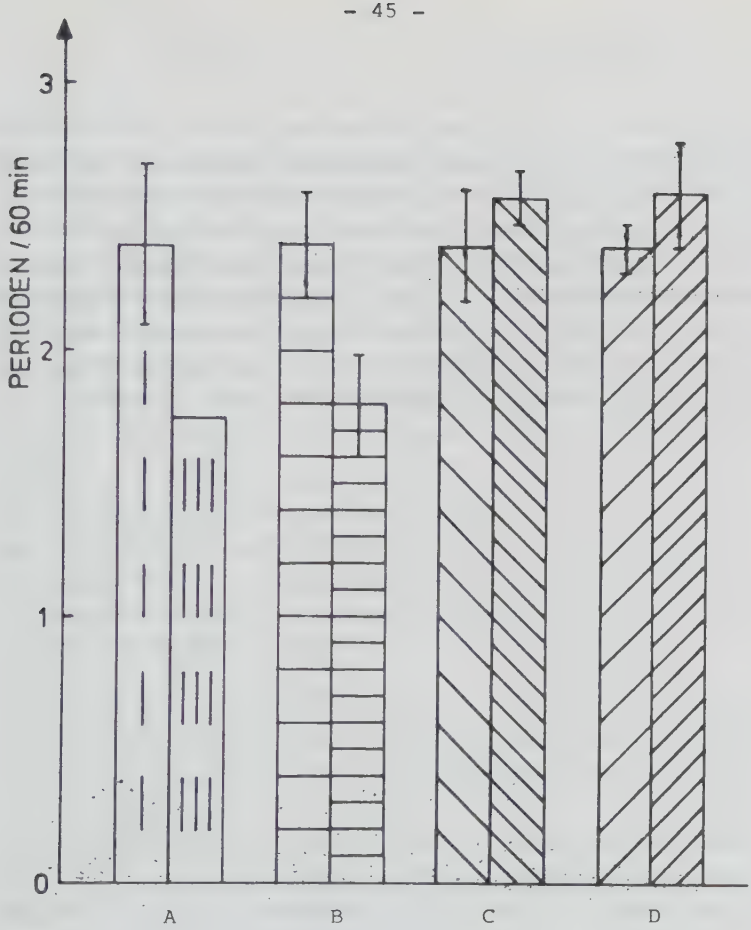

Abb. 13

Mittlere Frequenz der LH-Sekretion in den Gruppen A - D; die weit schraffierten Balken zeigen die Frequenz in der ersten Versuchshälfte, die eng schraffierten die Frequenz in der zweiten Versuchshälfte an.

A: Keine Substitution,

B: Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung,

C: Substitution mit Haemaccel,

D: Substitution mit Eigenerythrozyten.

3.3 ÜBERLEBENSRATEN

Für alle Versuchsgruppen wurde die Überlebensrate 24 Stunden nach Beendigung des Versuchs bestimmt. Bei Gruppe A betrug sie lediglich 33 %. Der Allgemeinzustand der Versuchstiere erschien stark reduziert. Für die Gruppe B wurde eine Überlebensrate von 60% gefunden. Hier schien der Allgemeinzustand erheblich beeinträchtigt zu sein. In Gruppe C überlebten 80% der Tiere die folgenden 24 Stunden und in Gruppe D 100%. In diesen beiden letzten Gruppen verhielten sich die Tiere unauffällig verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

4 DISKUSSION

Es ist bekannt, daß Streß über die Achse Gehirn - Hypophyse - Nebenniere das endokrine System beeinflußt (2). Im Tierversuch müssen daher z. B. die Narkose, der Umgang mit den Tieren oder eine Veränderung ihrer gewohnten Umgebung als mögliche Streßfaktoren in Betracht gezogen werden. Es wurde verschiedentlich berichtet, daß hierdurch Konzentrationsveränderungen der Gonadotropine im Plasma bewirkt werden können (1, 3, 9, 26). Über den Einfluß chronischer Entblutung auf die LH-Konzentration im Plasma liegen dagegen nur wenige Informationen vor (23). Mehrere Faktoren scheinen hierbei von Wichtigkeit zu sein:

1. Das Volumen der einzelnen Blutentnahme
2. Das entnommene Gesamtvolumen
3. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Entnahmen
4. Die Gesamtdauer der Blutentnahme
5. Die Art der Substitution

Die vorliegende Untersuchung hatte nun zwei Ziele:

1. Die Auswirkung des protrahierten Blutverlustes über einen längeren Zeitraum (3 Stunden) auf das LH-Muster sollte untersucht werden.
2. Eine Methode sollte entwickelt werden, die Blutentnahmen über einen längeren Zeitraum in ausreichender Menge unter Standardbedingungen ermöglicht, ohne daß sich das LH-Muster im Plasma verändert. Dafür wurden drei verschiedene Substitutionsverfahren getestet.

Die unter 2.3.4 beschriebene Versuchsanordnung ließ es zu, daß sich die Tiere ungehindert in ihrem Käfig bewegen konnten und auch während der Entnahmen freien Zugang zu Futter und Wasser behielten. Eine Zwangsimmobilisation wurde so vermieden. Da Pflege und Durchführung der Experimente in einer Hand lagen, konnten die Tiere sich in der 30 Tage dauernden Vorbereitungszeit an die Person des Untersuchers gewöhnen. Während dieser Zeit wurden die Tiere in demselben Laboratorium

gehalten, in dem später die Experimente erfolgten. So konnte ein Raumwechsel vermieden werden, der zu Veränderungen der Gonadotropinkonzentrationen im Plasma führen kann (10). Während der Blutentnahmen verhielten sich die Tiere unauffällig bezüglich ihrer Reaktionen gegenüber exogenen Reizen wie z. B. den unvermeidlichen Laborgeräuschen und wechselnden Geruchseinflüssen. Sie wichen in ihrem Verhalten nicht von dem unbehandelter Kontrolltiere ab. Lediglich bei Eintreten eines größeren Volumenmangels ließ die motorische Aktivität erheblich nach. Dies wurde nur bei Gruppe A beobachtet.

Die gewählte Versuchsanordnung hatte so den Vorteil, daß Einflüsse vermieden werden konnten, die sich sichtbar störend auf das Verhalten der Versuchstiere hätten auswirken können. Daneben konnten auch die anderen anfangs erwähnten Kriterien eingehalten werden, die bei Blutentnahmen im Rahmen endokrinologischer Untersuchungen beachtet werden sollten. So können 170 Minuten für die Beobachtung des LH-Konzentrationsverlaufes bei ovarektomierten Ratten als ausreichend langer Zeitraum angesehen werden. Der Abstand von 10 Minuten zwischen zwei Entnahmen erfaßt die wesentlichen Konzentrationsänderungen, wobei es durchaus möglich ist, diesen Abstand noch weiter zu verringern. Zusätzlich ist es sehr wahrscheinlich, daß unter Verwendung von Haemaccel oder Eigenerythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung bei Bedarf die Versuchszeit noch verlängert werden kann. Dieser Schluß scheint auf Grund der in diesen beiden Gruppen gefundenen ausgezeichneten Überlebensraten, der stabilen Elektrolytverhältnisse sowie der unveränderten LH-Fluktuationen gerechtfertigt zu sein.

Ein weiterer Vorteil dieses Blutentnahmeverfahrens ergibt sich durch das Vermeiden von Schmerzreizen. Dadurch ist eine Narkose nicht erforderlich. Das jeweils gewonnene Blutvolumen von 450 µl ist für die quantitative Analyse mehrerer Plasmabestandteile ausreichend.

Die Entnahme von 40 % des Gesamtblutvolumens erfordert, wenn das Überleben des Versuchstiers erwünscht ist, eine ausreichende Volumensubstitution. Es ist bekannt, daß Entnahmen

von je 0,2 ml Blut im Abstand von 10 Minuten über 3 Stunden keinen erkennbaren Einfluß auf das LH-Muster der ovarektomierten Ratte haben (6). Bei mit Östradiol-17ß, Progesteron und Thyroxin vorbehandelten ovarektomierten Ratten wurde sechsmal je 1 ml Blut innerhalb von 60 Minuten entnommen (23). Eine sofortige Substitution durch 5 %ige Rinderalbuminlösung genügte, um einen größeren Anstieg der LH-Konzentration im Plasma zu vermeiden. Durch akuten Blutverlust von 6 ml innerhalb von 1o Minuten wurde die LH-Konzentration im Plasma ovarektomierter, mit Äther narkotisierter Ratten nicht verändert (23). Der bei diöstrischen Ratten beobachtete Anstieg der LH-Konzentration nach akutem Blutverlust (23) zeigt, daß nicht nur die Versuchsbedingungen, sondern auch die endokrine Ausgangssituation berücksichtigt werden müssen.

Vor der Diskussion der im Rahmen dieser Untersuchung aufgetretenen Änderungen des LH-Musters in Abhängigkeit von den verschiedenen Versuchsanordnungen soll zunächst die technische Durchführbarkeit der einzelnen Verfahren erörtert werden.

Bei Verzicht auf jegliche Volumensubstitution scheint der Arbeitsaufwand geringer zu sein als bei den anderen Verfahren. Diese Methode ist aber allein schon deswegen ungeeignet, weil der Katheter gewöhnlich nach einigen Entnahmen undurchgängig wird. Eine Verdopplung der stündlichen Heparingabe konnte dies ebensowenig verhindern wie eine Auffüllung des Katheters mit 20 USP. E. Heparin in 0,9 %iger NaCl-Lösung nach jeder Entnahme. Ob die Thrombosierung im Rahmen der disseminierten intravaskulären Gerinnung, die beim protrahierten Volumenmangelschock auftritt, erfolgt, oder ob andere Vorgänge hierfür verantwortlich sind, konnte nicht geklärt werden.

Bei den drei Gruppen, die substituiert wurden, konnte die nach jeder Entnahme erfolgende Durchspülung des Katheters mit den verschiedenen Substitutionslösungen seine Durchgängigkeit über den Versuchszeitraum sicherstellen. Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich diese Überlegungen ausschließlich auf diskontinuierliche Entnahmen beziehen.

Die Substitution mit physiologischer NaCl-Lösung bietet keine technischen Probleme. Der Arbeitsaufwand ist im Vergleich zu den eben genannten Verfahren nur wenig höher, die Zeitabstände zwischen den einzelnen Entnahmen müssen aufgrund der zwischengeschalteten Infusionen größer sein. Eine Thrombosierung des Katheters wurde in keinem Fall beobachtet.

Auch die Verwendung von Haemaccel ist im wesentlichen unkompliziert. Haemaccel sollte allerdings nicht im Katheter belassen werden, denn es traten dann häufig Thrombosierungen auf. Durch eine sofortige Auffüllung des Katheters mit 0,9 %iger NaCl-Lösung wurde diese Komplikation in den meisten Fällen vermieden. Lediglich im letzten Versuchsdrittel kam es gelegentlich zu Thrombosierungen. Dafür gibt es eine Reihe von Ursachen (11):

Die Viskosität des Blutes wird durch Gelatinepräparate wie Haemaccel im allgemeinen erhöht.

Haemaccel steigert die Senkungsgeschwindigkeit durch Veränderung der Plasmazusammensetzung.

Die Aggregation der Erythrozyten wird durch Haemaccel begünstigt, denn die hochmolekularen Bestandteile (MG 4 300 bis 280 000) verringern das negative Oberflächenpotential der Erythrozyten und dadurch deren Abstand voneinander.

Die Bereitschaft zur Gerinnung wird demnach trotz fortschreitender Hämodilution gefördert, kann aber gewöhnlich durch die angegebenen Maßnahmen unterdrückt werden. Die kleinstmöglichen Zeitabstände zwischen den einzelnen Entnahmen sind somit etwas größer als bei Substitution mit NaCl-Lösung.

Der Volumenersatz durch Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung erfordert einen erheblichen Arbeitsaufwand. Durch die nach jeder Entnahme notwendige Aufbereitung der gewonnenen Erythrozyten muß der Zeitabstand zwischen zwei Entnahmen wenigstens 5 Minuten betragen. Eine Thrombosierung des Katheters wurde in keinem Fall beobachtet.

Neben diesen technischen Aspekten ist die Verträglichkeit einer Substitution für das Versuchstier ein ganz entscheidender, weil limitierender Faktor. Hiervon hängt es letztlich ab,

in welchem Umfang und über welchen Zeitraum Blut entnommen werden kann. Dabei müssen Störungen, die sich bereits nach kurzer Zeit auswirken, von solchen unterschieden werden, die erst nach längerer Zeit beobachtet werden können. So kann Haemaccel in seltenen Fällen anaphylaktische Reaktionen beim Menschen auslösen (11). Von Dextran, einem glucopolysaccharidhaltigen Plasmaersatzmittel, ist bekannt, daß es Histamin und 5-Hydroxytryptamin bei der Ratte liberiert und dadurch toxisch wirkt (11). In der vorliegenden Arbeit wurde bei keinem Tier eine anaphylaktische Reaktion beobachtet. Um die langfristige Verträglichkeit der verschiedenen Substitutionen zu objektivieren, wurde die Überlebensrate nach 24 Stunden in den einzelnen Gruppen festgestellt.

Erwartungsgemäß hat der Volumenmangel bei fehlender Substitution die niedrigste Überlebensrate zur Folge. So starben bereits vor Ende der Entnahmezeit 50 % der Tiere. Nach 24 Stunden lebten in dieser Gruppe nur noch 33 %, die zudem im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren einen stark beeinträchtigten Allgemeinzustand zeigten.

Bei der Verwendung von 0,9 %iger NaCl-Lösung betrug die Überlebensrate eine Stunde nach Versuchsende 80 %, nach 24 Stunden lebten noch 60 % der Tiere. Allerdings zeigte auch diese Gruppe eine herabgesetzte Reaktionsbereitschaft gegenüber äußeren Einflüssen. Daher ist dieses Verfahren retrospektiv betrachtet wenig befriedigend.

Die Überlebensrate nach 24 Stunden betrug in den beiden übrigen Gruppen 80 % (Haemaccel) bzw. 100 % (Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung). In beiden Gruppen zeigten die Tiere keine erkennbaren Verhaltensänderungen verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren.

Neben diesen technischen Aspekten war es für die vorliegende Untersuchung jedoch von Wichtigkeit, festzustellen, ob eine Veränderung des LH-Musters während des Versuchszeitraums beobachtet werden konnte.

In der Versuchsgruppe ohne Substitution wurde den Tieren 40 %

ihres Blutvolumens entnommen. Die Plasmaeiweißkonzentration nahm im gleichen Zeitraum um 31 % ab. Die mittlere LH-Konzentration blieb dagegen unverändert. Dies traf auch auf die übrigen Gruppen zu. Eine Nivellierung der maximalen und minimalen LH-Ausschüttung im Sinne einer Amplitudenverkleinerung wurde ebenfalls in keiner Gruppe beobachtet.

Für die LH-Frequenz konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den vier Gruppen gesichert werden. Sie war in den Gruppen A und B mit 2,1 bzw. 2,0/60 Minuten niedriger als in den Gruppen C und D mit je 2,5/60 Minuten. Bei genauerer Betrachtung der erhobenen Befunde zeigte sich, daß dieser Unterschied durch Frequenzänderungen in der zweiten Versuchshälfte bedingt war. Innerhalb der ersten Versuchshälfte war die Frequenz mit 2,4/60 Minuten für alle Versuchsgruppen gleich. Erst zwischen 90 und 170 Minuten traten die bei den Gruppen A und B bzw. C und D beschriebenen unterschiedlichen Frequenzen (1,9 bzw. 1,8/60 Minuten gegenüber jeweils 2,6/60 Minuten) auf.

Der Zeitpunkt des Auftretens von Frequenzänderungen sowie die Tatsache, daß nur die unzureichend substituierten Gruppen davon betroffen wurden, weisen auf mögliche Ursachen hin:

Durch die Substitution mit Haemaccel konnte eine Veränderung osmotischer Druckverhältnisse im Plasma verhindert werden, während bei Substitution von Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung der Hämoglobingehalt nahezu unverändert blieb. Da bei beiden Verfahren die LH-Frequenz konstant blieb, dürften weder eine Änderung des osmotischen Druckes noch eine Abnahme der Sauerstofftransportkapazität in der hier angegebenen Größenordnung allein für Frequenzänderungen verantwortlich sein. Welche Bedeutung der gleichzeitigen Änderung dieser beiden Faktoren zukommt, muß durch weitere Experimente geklärt werden.

Es gibt Hinweise aus verschiedenen Vorversuchen zu dieser Arbeit, daß unter anderem die adrenalen Hormone bei der Regulation der LH-Sekretion unter den angegebenen Versuchsbedingungen beteiligt sein könnten. Welchen Einfluß die Tageszeit hat und ob die Rhythmusänderungen reversibel sind , bleibt

weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Es darf jedoch aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, daß sich die LH-Frequenz der ovarektomierten Ratte durch protrahierten Volumenmangel nach einiger Zeit verändert. Um diesen Effekt zu vermeiden, sollte man bei Experimenten, die sich mit der LH-Sekretion befassen und mit größeren Blutverlusten einhergehen, ausreichend substituieren.

In dieser Untersuchung erwiesen sich zwei unterschiedliche Substitutionsverfahren als geeignet, um bei der ovarektomierten Ratte Blutproben von ausreichendem Volumen unter standardisierbaren Bedingungen über einen langen Zeitraum zu gewinnen. Weder bei der Substitution mit Haemaccel noch bei Verwendung von Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung wurde das LH-Muster verändert. Der erforderliche technische Aufwand erscheint bei beiden Verfahren vertretbar. Gemessen an der Überlebensrate der Tiere ist die Verträglichkeit zufriedenstellend.

Da auch keine Beeinflussung der Analysen, insbesondere des Radioimmunoassays, durch die Verwendung von Haemaccel festgestellt werden konnte, ist die Entscheidung für eines der beiden Substitutionsverfahren lediglich durch experimentelle Notwendigkeiten bestimmt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von chronischer Entblutung und verschiedenen Substitutionsverfahren auf das LH-Muster im Plasma ovarektomierter Ratten untersucht. Dafür wurde eine Entnahmetechnik entwickelt, die es gestattete, über mehrere Stunden in kurzen Zeitabständen Blut in einer für verschiedene Bestimmungen ausreichenden Menge zu gewinnen. Gleichzeitig sollten eine Störung der Lebensbedingungen des Versuchstieres sowie eine Beeinträchtigung der radioimmunologischen LH-Bestimmung vermieden werden.

Die Versuche wurden an 180 - 200 g schweren, weiblichen Ratten, die 30 Tage zuvor ovarektomiert worden waren, durchgeführt. Die Arteria carotis communis wurde katheterisiert. Nach mindestens 24 Stunden Wartezeit wurden bei den Tieren im Abstand von 10 Minuten je 450 µl Blut über einen Zeitraum von drei Stunden gewonnen. Das entnommene Volumen wurde bei einer Versuchsgruppe nicht substitutiert, in den anderen Gruppen wurden 0,9 %ige NaCl-Lösung, Haemaccel oder in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmte Eigenerythrozyten infundiert. Während der Versuche konnten die gewohnten Lebensumstände der Versuchstiere beibehalten werden.

Für die LH-Bestimmung wurde ein Radioimmunoassay eingeführt; er wurde durch die verwendeten Substitutionsverfahren, insbesondere Haemaccel, nicht beeinflußt.

Bei Unterlassung der Substitution sowie bei alleiniger Substitution mit 0,9 %iger NaCl-Lösung veränderte sich das LH-Sekretionsmuster. Während Mittelwert und Amplitude der rhythmischen Pulsationen über die gesamte Versuchsdauer konstant blieben, verringerte sich die Frequenz in der zweiten Versuchshälfte signifikant. Dieser Effekt trat bei Verwendung von Haemaccel bzw. Eigenerythrozyten in 0,9 %iger NaCl-Lösung nicht auf.

Es wurden außerdem in jeder Blutprobe Hämoglobin, Eiweiß, Na^+ und K^+ bestimmt. Es ergab sich, daß weder Sauerstoffmangel durch erheblichen Erythrozytenverlust noch eine Abnahme des

kolloidosmotischen Druckes durch Verringerung der Eiweißkonzentration als alleinige Ursache der LH-Frequenzänderung angesehen werden können. Elektrolytstörungen traten nur in Ausnahmefällen auf und gaben somit keine brauchbaren Hinweise auf die auslösende Ursache der Frequenzänderung. Eine gemeinsame Beteiligung vieler z. B. auch endokriner Faktoren ist wahrscheinlich.

Für Untersuchungen der LH-Sekretion der ovarektomierten Ratte bieten sich zwei technisch leicht durchzuführende Verfahren an, wenn größere Blutentnahmen über mehrere Stunden notwendig sind: Der Volumenersatz durch Eigenerythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung und die Substitution mit Haemaccel.

L I T E R A T U R

1 Ajika, K., Kalra, S. P., Krulich L. und S. M. Mc Cann
Endocrinology 90, 707 (1972)

2 Allen, J. P., Allen, C. F., Greer, M. A. und J. J. Jacobs
In: Brain-Pituitary-Adrenal Interrelationship
Brodish, A. und E. S. Redgate (Eds.)
Karger, Basel, 99 (1973)

3 Beattie, C. W., Campbell, C. S., Nequin, L. G., Soyka,
L. F. und N. B. Schwartz
Endokrinology 92, 1634 (1973)

4 Berson, S. A., Yalow, R. S., Glick, S. M. und J. Roth
Metabolism 13, 1135 (1964)

5 Blake, Ch. A.
Endocrinology 95, 572 (1974)

6 Blake, Ch. A.
Endocrinology 95, 999 (1974)

7 Blake, Ch. A. und R. S. Sawyer
Endocrinology 91, 87, (1972)

8 Breuer, H. und L. Nocke-Finck
Mitteilungsblatt d. Dt. Ges. f. Klin. Chem. 2, 3 (1973)

9 Döhler, K. D., Mühlen, A. von zur, Gärtner, K. und U.
Döhler
Acta endocrinologica, Suppl. 202 (1976)

10 Euker, J. S., Meites, J. und G. D. Riegle
Endocrinology 96, 85 (1975)

11 Forth W., Henschler D. und W. Rummel
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
B. J. Wissenschaftsverlag, Mannheim (1975)

12 Faimann, C. und R. J. Ryan
J. Clin. Endocrinol. 27, 44 (1967)

13 Gnodde, H. P. und G. A. Schuiling
Neuroendocrinology 20, 212 (1976)

14 Greenwood, F. C., Hunter, W. M. und J. S. Glover
Biochemical Journal 89, 114 (1963)

15 Hallmann, L.
Klinische Chemie und Mikroskopie
Thieme, Stuttgart

16 Kalra, S. P. und S. M. McCann
Neuroendocrinology 15, 79 (1974)

17 Lawson, D. M. und R. R. Gala
J. Endocrinol. 62, 75 (1974)

18 Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L. und R. J. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

19 Midgley, A. und Jr. Rees
Endocrinology 79, 10 (1966)

20 Midgley, A. und Jr. Rees
J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 295 (1967)

21 National Institutes of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases, National Institutes of Health
Rat Pituitary Hormone Distribution Program
Radioimmunoassay of Rat Luteinizing Hormone (1976)

22 Odell, W. D., Rayford, P. 1. und G. T. Ross
J. Lab. Clin. Medicine 70, 973 (1967)

23 Seyler, L. E., Reichlin, J. R. und S. Reichlin
Endocrinology 92, 295 (1973)

24 Soper, B. D. und R. F. Weick
Neuroendocrinology 23, 306 (1977)

25 Steel, R. G. D. und J. H. Torrie
Principles and Procedures of Statistics
McGraw Hill, New York

26 Turpen, C., Johnson, D. C. und J. D. Dunn
Neuroendocrinology 20, 339 (1976)

27 Weitzman, E. D., Fukushima, D., Nogeire, C., Roffwarg, R.,
Gallagher, T. F. und L. Hellmann
J. Clin. Endocrinol. 33, 14 (1971)

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. H. Breuer danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor des Institutes für Klinische Biochemie der Universität Bonn.

Herrn Dr. H. Th. Schneider danke ich für seine Unterstützung, Frau Dr. D. Jönsson für wertvolle Hinweise und Frau U. Küchler für die Durchführung der Proteinbestimmung.

L E B E N S L A U F

Am 21, Juni 1952 wurde ich als Tochter des Arztes Professor Dr. M. Busch in Göttingen geboren. Nach Schulbesuchen in Waldkirch, Freiburg und Abbots Bromley (Großbritannien) bestand ich 1970 die Reifeprüfung in Marburg/Lahn.

Ich bin mit dem Diplomchemiker Dr. M. Kraft seit 1969 verheiratet. Meine Tochter Annette wurde 1971 geboren.

1974 begann ich mit dem Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und legte 1976 die ärztliche Vorprüfung ab. Es folgten 1977 die erste und 1979 die zweite ärztliche Prüfung. Die dritte ärztliche Prüfung bestand ich 1980.

Ich absolvierte im Rahmen des dritten klinischen Studienabschnittes den internistischen Teil an der Medizinischen Poliklinik der Universität Bonn und meine Ausbildung in Chirurgie und Pädiatrie in der Johanniter-Kinderklinik in Sankt Augustin.

Von 1976 bis 1978 war ich zunächst als Doktorand, dann als Mitarbeiter bei wissenschaftlichen Untersuchungen im weiteren Zusammenhang mit der Thematik meiner Dissertation im Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn unter der Leitung von Professor Dr. H. Breuer tätig.